

Az
OKTOPIN-TIPUSU AGROBACTERIUM TUMEFACIENS
TUMORINDUKÁLÓ-PLAZMID TR-RÉGIÓJÁNAK INTEGRÁLÓDÁSA
NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA PROTOPLASZT-TRANSZFORMÁCIÓS
RENDSZERBEN

DOKTORI DISSZERTÁCIÓ

Készítette: C Z A K Ó MIHÁLY
MTA SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONT
NÖVÉNYÉLETTANI INTÉZET

1986.



T A R T A L O M

| | Old. |
|---|------|
| 1 ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS | 3. |
| 2 CÉLKITÜZÉS | 4. |
| 3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS | 5. |
| 4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK | 11. |
| 4.1 Baktérium törzsek és fönntartásuk | 11. |
| 4.2 Növények nevelése és szövettenyésztés | 12. |
| 4.3 Protoplaszt izolálás és szövettenyésztés | 13. |
| 4.4 Transzformáció együtt-tenyésztéssel | 13. |
| 4.5 Tumorindukció steril növényeken | 15. |
| 4.6 Opinok kimutatása | 15. |
| 4.6.1 Oktopin szintáz aktivitás kimutatása | 15. |
| 4.6.2 Agropin és mannopin kimutatás | 16. |
| 4.7 DNS izolálás növényi szövetből | 17. |
| 4.8 <u>Escherichia coli</u> plazmid DNS izolálás | 18. |
| 4.9 DNS emésztés restrikciós endonukleázokkal | 19. |
| 4.10 Gélelektroforézis és a DNS kötése nitrocellulóz filterre | 20. |
| 4.11 A DNS jelölése rádióaktív foszforral | 20. |
| 4.12 DNS - DNS molekuláris hibridizáció és autoradiográfia | 21. |
| 5 KISÉRLETI EREDMÉNYEK | 23. |
| 5.1 <u>Nicotiana plumbaginifolia</u> protoplasztok tenyésztése <u>Agrobacterium tumefaciens</u> -szel különböző hormonösszetételű tápoldatokban | 23. |
| 5.2 Hormonautotrófia és oktopin szintáz a szelektált klónokban | 26. |
| 5.3 Agropin és mannopin a szelektált klónokban | 31. |
| 5.4 Növényregeneráció a transzformált sejtvonalakból; a TR - DNS markerek öröklődése | 35. |
| 5.5 A T - DNS szerkezetének vizsgálata a <u>101</u> -es sejtvonalban DNS - DNS molekuláris hibridizációval | 39. |
| 6 MEGVITATÁS | 43. |
| 7 ÖSSZEFOGLALÁS | 49. |
| 8 FÜGGELÉK | 51. |
| 9 FÜLHASZNÁLT IRODALOM | 53. |

1 ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

A molekuláris biológia az utóbbi években érte el azt a szintet, hogy a növények genetikai manipulációja terén megszülethettek az első, még csak alapkutatósi szempontból érdekes eredmények. Ezt a fejlődést jelentős részben az Agrobacterium tumefaciens által okozott növényi tumorokról szerzett ismeretek tették lehetővé. Az agrobakterium saját génjeit képes beültetni a növényi genomba, és ezek - működése vezet a tumor kialakulásához. A tumorfejlődés genetikai-fiziológiai hátterének, az agrobaktérium onkogének hatásmechanizmusának felderítése részben az agrobaktériumokról, részben a növényi test szerveződéséről, a növényi sejtek differenciálódásáról nyújthat alapvető információkat. Kiderült, hogy az agrobaktériumok génátviteli rendszere felhasználható arra, hogy tetszőleges géneket és DNS szekvenciákat juttassanak be növényekbe. A növényi sejt totipotens, de az eltérő funkcióju növényi szövetek sejtjeiben a genomnak más-más, meghatározott része aktív. A szövet-, fejlődés- és ingerspecifikus génexpresszióért a DNS-en meghatározott szabályozó bázisszekvenciák felelősek. Már most, amikor a növényekbe génbevitelre még a Ti-plazmidok a legalkalmasabbak, tág perspektívák nyílnak a növények irányított genetikai átalakítása terén. Elérhető lesz, hogy a tetszőleges gén - amit a növényekbe beültetnek - meghatározott szövetben, meghatározott fejlődési állapotban, vagy meghatározott hatásra aktiválódjon. A növények saját génjeinek átprogramozása felé is ezen az úton kell haladni.

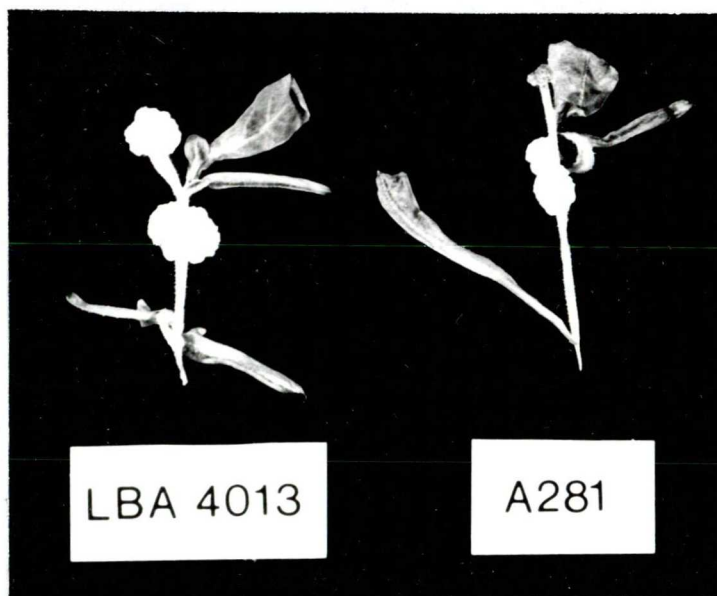
2 CÉLKITÜZÉS

A növényi sejtgenetika vizsgálati alanya a növényi sejt, amely totipotens, genetikailag egyenértékű a teljes növényvel. Az agrobaktérium képes az izolált növényi sejteket is transzformálni, vagyis a génjeit a genomba bejuttatni. Az egysejtes rendszer előnye, hogy nagyszámú növényi sejt tenyészthető együtt az agrobaktériumokkal kontrollált körülmények között és nagyszámú független transzformált sejt keletkezik egyidejűleg, tehát tanulmányozhatók az egyedi transzformációs események.

A célunk az volt, hogy létrehozzunk egy jól jellemzett egysejtes transzformációs rendszert a Nicotiana plumbaginifolia növényfajban, amely egyike a molekuláris biológia modell vizsgálati alanyainak.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az Agrobacterium tumefaciens egy szaprofita talajbaktérium. Egyes törzsei azonban a gyökérnyakgolyva kórokozói /Smith és Townsend, 1907/. A baktérium sebzési helyeken támad és nyitvatermő, valamint kétszikű növényeken okoz daganatot /1. ábra/, vagy teratómát /De Cleene és Deley, 1976/.



1. Ábra: Agrobacterium tumefaciens /LBA 4013 és A281 törzsek/ által okozott tumorok Nicotiana plumbaginifolia növényen

A kórokozó törzsek virulenciájáért extrakromoszómális elem, az un. tumorindukáló-plazmid /Ti-plazmid/ felelős /Van Larebeke et al., 1975/. A tumoros transzformáció során a

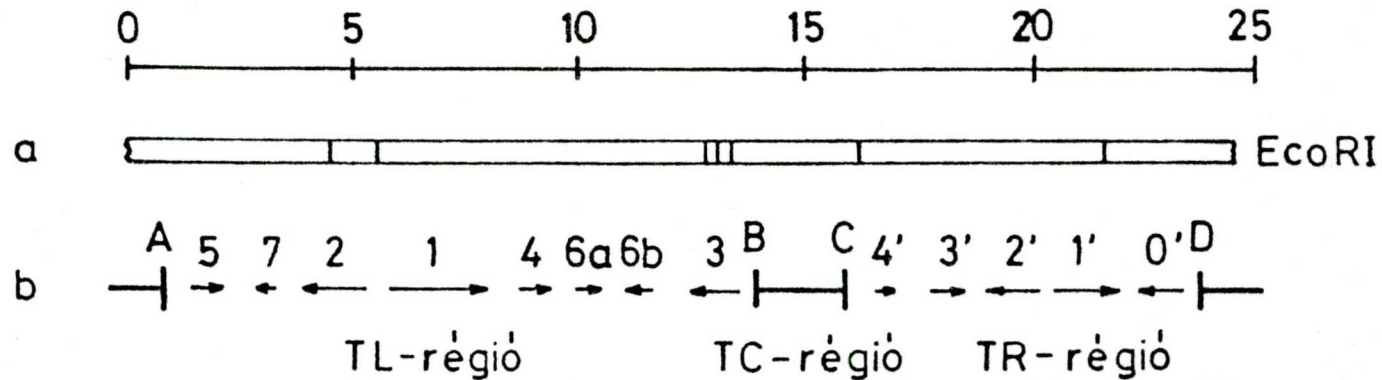


Ti-plazmid egy szegmentje bejut a növényi sejtbe és integrálódik a genomba. Ez a T-DNS /Chilton et al., 1977, 1980; Schell et al., 1979; Lemmers et al., 1980/. A T-DNS-en elhelyezkedő gének aktivitása vezet a tumor kifejlődéséhez.

A tumorszövet, eltérően a legtöbb normál növényi szövetből, hormonautotróf, in vitro nem igényel auxint és citokinint /Braun és White, 1943/. Továbbá, olyan kismolekulájú vegyületeket szintetizál, amelyek normál növényi szövetekben nem fordulnak elő, és amelyeket csak az adott tumort kiváltó agrobaktérium törzs képes fölhasználni, mint kizárólagos szén- és nitrogénforrást. Ezek az un. opinok tehát fontos elemei a parazitizmus e speciális formájának; a genetikai kolonizációnak /Schell et al., 1979/. Az agrobaktérium törzsek, illetve a Ti-plazmidok csoportosítása lehetséges éppen az opinok alapján /Tempé és Petit, 1983/.

Az oktopin-típusú Ti-plazmidok szerveződése jól ismert /2. ábra/. A T-régióból származik a T-DNS, amely a növényi genomba integrálódik. A virulencia régióban vannak azok a gének, amelyek a T-DNS bejuttatásáért és integrálásáért felelősek. Ugyancsak a Ti-plazmidon helyezkednek el az opinok hasznosításáért felelős gének /Holsters et al., 1982/. A T-régió DNS szekvenciája ismert /Gielen et al., 1984/ és ennek alapján három szegmentre osztható: TL-, TC- és TR-régiók /Barker et al., 1983/. A növényi sejtbe bizonyítottan csak a TL- és TR-régió épül be /Thomashow et al., 1980/. Mindkettőt mindkét oldalon egy

Kilobázispár



2. Ábra: Az oktopin-típusú Ti-plazmidok T-régiójának fizikai térképe /a/; *EcoRI* restrikciós endonukleáz hasítóhelyek a T-régióban. A T-régió funkcionális szerveződése /b/. A, B, C és D: 25 bázispár hosszú konzervatív szekvenciák, amelyek a T-régiókat határolják. A nyilak a tumorspecifikus messenger RNS-eket jelölik a transzkripció irányával.

erősen konzervatív 25 bázispár hosszúságú DNS szekvencia határolja, de a T-régiókban több olyan szekvencia is van, amely részlegesen homológ a határszekvenciákkal és helyettesítheti azokat.

A TL-DNS-ről a növényi sejtben nyolc messenger RNS íródik át /2. ábra/, ebből négynek megfelelő gént azonosítottak /Leemans et al., 1982/. A 3-as az oktopin szintáz gén /Schröder et al., 1981/. Az oktopin szintáz katalizálja a tumorszövetben az egyik opin, az oktopin szintézisét /Otten és Schilperoort, 1979/. A 4-es gén a citokinin növényi hormoncsoport bioszintézisének első lépését katalizáló enzimet kódolja. A 4-es gén tehát citokinin túltermelésért és a gyökérfejlődés gátlásáért felelős /Akiyoshi et al., 1984/. Az 1-es és 2-es gének termékei triptofánból az indol-3-ecetsav növényi hormont szintetizálják, így auxin túltermelésért és a hajtásfejlődés gátlásáért felelősek /Schröder et al., 1984/. Az 1-es, 2-es gének, illetve a 4-es gén felelősek a hormonautotróf növekedésért. A TR-DNS-ről öt mRNS íródik át /2. ábra/, amelyekből háromhoz sikerült funkciót rendelni transzpozon inszerciós mutagenézissel. A három gén opinok, többek között a mannopin és agropin bioszintézisét irányítja /Ellis et al., 1984/. A 2-es gén glükózt konjugál glutaminnal, illetve glutaminsavval, az 1'-es gén a konjugátumokat redukálja mannopinná, illetve mannopinsavvá, míg a 0'-s gén a mannopint ciklizálja agropinná. Összefoglalva tehát, az oktopin-típusú agrobaktérium törzsek által kiváltott tumor hormonautotróf és mivel a hajtás- és gyökérfejlődés gátolt,

organizálatlan kalluszként nő szövettenyészetben. Fő opin-
jai az oktopin, mannopin és agropin. A hormonautotrófia és
az oktopin szintáz a TL-DNS jelenlétére utal, a mannopin és
az agropin a TR-DNS markerei.

A növényeken kifejlődő tumorszövetben általában megta-
lálható az összes tumormarker /Dahl és Tempé, 1983/. Ezzel
szemben a szövettenyészetben tartott, klónozott, vagy klóno-
zatlan tumorszövetben általában nincs agropin és mannopin.
Ennek megfelelően az eddig vizsgált tumorszövetek közül
csak kevésben találtak TR-DNS-t /Nester et al., 1984/.

A tumormarkerek kifejeződésében még nagyobb változatosság
mutatkozik az egysejtes transzformációs rendszerben, ahol
növényi sejteket tenyésztnek együtt agrobaktériumokkal,
majd a transzformánsokat hormonmentes táptalajon szelektál-
ják /Márton et al., 1979/. Az így kapott Nicotiana tabacum
sejtvonalak között volt hormonautotróf organizálatlan kal-
lusz és hormonautotróf hajtásteratóma /gyökérfejlődés gá-
tolt/. Mindkettő lehetett oktopin szintáz pozitív vagy ne-
gativ /Márton et al., 1979; Wullems et al., 1981a/.

Az egysejtes transzformációs rendszerek növényi eleme
a protoplaszt, a sejtfalától enzimatikus uton megfosztott
növényi sejt. A protoplaszt ozmotikusan stabilizált körül-
mények között, szintetikus táptalajon sejtfalat regenerál
és osztódik. A táptalaj ásványi sókat, vitaminokat, cukrot
és növényi hormonokat tartalmaz. A legtöbb növény, köztük
a Nicotiana plumbaginifolia protoplasztjai regenerációjához
és osztódásához két típusú hormonra, auxinra és citokininre

van szükség. Végző soron a két hormon együttes hatása szükséges a sejtciklus normális lefolyásához /Naylor et al., 1954/. Szövetszinten a magas citokinin /auxin arány a hajtás regenerációnak, míg az alacsony a gyökérfejlődésnek kedvez /Skoog és Miller, 1957/.

A protoplasztok a regeneráció különböző stádiumaiban nem egyformán fogékonyak a transzformációra. A N. tabacum protoplasztokat az izolálás után 3 nappal, amikor már rendelkeztek új sejtfallal és éppen osztódás előtt álltak, lehetett a legnagyobb gyakorisággal transzformálni /Márton et al., 1979/. A hormonoknak hatása van a sejtciklus alakulására, feltehetően tehát a transzformáció iránti fogékony-
ságra is. Szintetikus és természetes auxinok és citokininek tumorfejlődésére gyakorolt hatását vizsgálva /pl. izolált szerveken/ eddig csak vagy nem specifikus, vagy paradox hatásokat észleltek /Bouckaert-Urban and Vendrig 1981; Hrouda et al., 1983/. Ennek oka az lehetett, hogy komplex volt a vizsgálati objektum. Az egysejtes transzformációs rendszer jóval egyszerűbb és a körülmények jobban kontrollálhatók.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Baktérium törzsek és fönntartásuk

1. Táblázat: A kísérletekhez használt baktérium törzsek

| Törzs | Plazmid | Jellemzők | Hivatkozás |
|-------------------------------------|-----------|------------------------------------|------------------------|
| <u>Agrobacterium tumefaciens</u> | | | |
| Ach5 ^a | pTi Ach5 | Oktopin szintáz, agropin és manno- | Tempé és Petit /1983/ |
| LBA 4013 ^a | pAL 102 | pin a tumorban | |
| | | A pTi Ach5 pont- | Klapwijk et al. /1980/ |
| | | mutánsa /Konstitu- | |
| | | tív plazmidtransz- | |
| | | fer/ | |
| LBA 4011 ^a | - | Avirulens. Nincs | Klapwijk et al. /1980/ |
| | | Ti-plazmidja. | |
| A281 ^b | pTi Bo542 | Agropin és manno- | Guyon et al. /1980/ |
| | | pin a tumorban. | |
| <u>Escherichia coli^c</u> | | | |
| HB 101 | pGV0120 | A pTi Ach5 <u>BamHI</u> | De Vos et al. /1981/ |
| | | fragment No.2 kló- | |
| | | nozva pBR 322 plaz- | |
| | | midban | |
| HB 101 | pGV0153 | A pTi Ach5 <u>BamHI</u> | De Vos et al. /1981/ |
| | | fragment No.8 kló- | |
| | | nozva pBR 322 plaz- | |
| | | midban | |
| HB 101 | pGV0201 | A pTi Ach5 <u>HindIII</u> | De Vos et al./1981/ |
| | | fragment No.1 kló- | |
| | | nozva pBR 322 plaz- | |
| | | midban | |

^aR.A. Schilperoort /Leiden, Hollandia/; ^bM.-D. Chilton /St. Louis, USA/; ^cM. Van Montagu /Gent, Belgium/

Az E. coli törzseket 37°C -on neveltük LB táptalajon / 1 dm^3 -ben 10 g Bacto Tryptone, 5 g Bacto Yeast Extract, 10 g NaCl, 15 g Bacto Agar; $\text{pH}=7.2$; Miller, 1972/ 100 mg dm^{-3} ampicillin jelenlétében /De Vos et al., 1981/. Az Agrobacterium tumefaciens törzseket 27°C -on neveltük YTG táptalajon / 1 dm^3 -ben 10 g Bacto Tryptone, 1 g Bacto Yeast Extract, 1 g NaCl, 10 g glukóz, 1 mmol CaCl_2 , 1 mmol MgSO_4 ; $\text{pH}=7.2$; Márton, 1984/. A transzformációhoz a baktériumokat YTG táptalajon neveltük, majd centrifugálással /4000 x g, 10 perc/ összegyűjtöttük és protoplaszt táptalajban /lásd később/ szuszpendáltuk.

4.2 Növények nevelése és szövettenyésztés

A diploid / $2n=2X=20$ / és a portokkulturából nyert haploid / $n=X=10$ / Nicotiana plumbaginifolia növényeket steril hajtáskulturában tartottuk fönns /Sidorov és Maliga, 1982/. A táptalaj RM sókat /FÜGGELEK/ és szaharózt tartalmazott.

A szövettenyészetek táptalaját /RMOP/ kiegészítettük 100 mg dm^{-3} m-inozittal és $1,0\text{ mg dm}^{-3}$ tiamin hidrokloriddal, valamint literenként 0,1 mg 1-naftil-ecetsavval /NAA/ és 1.0 mg 6-benzil-adeninnel. A termosztátszobában 27°C -on napi 16 óráig 800 lux megvilágítást kaptak.

Csiráztatás előtt, a magokat 70 %-os etanollal /1 perc/ és husszorosra higitott háztartási Hypoval /nátrium-hipoklorit, 3 perc/ sterilizáltuk, majd desztillált vízzel alaposan mostuk. A magokat steril szűrőpapíron $0,5\text{ mg cm}^{-3}$ gib-

berellinsav jelenlétében csiráztattuk.

A csiranövényeket elvágva RMOP táptalajon kalluszosítottuk.

4.3 Protoplaszt izolálás és tenyésztés /Nagy és Maliga, 1976/

Nicotiana plumbaginifolia leveleket 0,4 M szaharózt tartalmazó K_3 /0,4 MSzK₃/ oldatban /FÜGGELÉK/ inkubáltuk egy éjszakán át 2 %-os Celluláz R-10 és 0,5 % macerozym R-10 enzimekkel /Yakult/. Az enzimoldatot nitrocellulóz filteren /0,45 um pórusu, Gelman Sciences, Inc./ szűrve sterilizáltuk. Az emésztetlen részeket 63 um-es nylon szűrőn szűrtük ki, majd a protoplaszt szuszpenziót 3 percig centrifugáltuk /80Xg/. A flotált protoplasztokat friss 0,4 MSzK₃ oldatban szuszpendáltuk és újra centrifugáltuk. Ezt a lépést 2-szer ismételtük. A tisztított protoplasztokat a megfelelő hormonösszetételű tápoldatban szuszpendáltuk. Egy napig sötétben tartottuk, majd fényre helyeztük.

4.4 Transzformáció együttenyésztéssel /Márton, 1984/

Levél protoplasztokat izoláltunk hormonmentes 0,4 MSzK₃ tápoldatban, majd 10^5 cm⁻³ denzitásban szuszpendáltuk megfelelő hormontartalmu friss táptalajban. Frissen nevelt agrobaktériumokat adtunk a szuszpenzióhoz / 10^8 cm⁻³/. A te-



nyészeteket 38 óráig tartottuk sötétben. Az inkubációs idő végére a sejtek összezsapódtak. Az összezsapódást, amit a baktériumok által termelt cellulózszálak okoztak, celluláz kezeléssel /2 h/ szüntettük meg; 0,5 % cellulázt adtunk filtersterilizált törzsoldatból. A baktériumok többségét mosással távolítottuk el. A W5 oldat /1 dm³-ben 9.0 g NaCl, 18.4 g CaCl₂·2H₂O, 0.4 g KCl, 1.0 g glukóz; pH=5.8; Menczel et al., 1981/ a 0,4 MSzK₃ táptalajjal izozmotikus, de jóval kisebb sűrűségű. A 0,4 MSzK₃ oldatot W5 oldattal higitva 5-szörösre elérhető, hogy a növényi sejtek ülepedjenek. W5 oldattal a mosást kétszer ismételtük. Az így tisztított növényi sejteket 4x10⁴ cm⁻³ denzitásban szuszpendáltuk friss táptalajban. Az agrobaktériumok újraszaporodását antibiotikumokkal gátoltuk /vankomicin és ampicillin 200-200 mg dm⁻³ koncentrációban/. Három - öt nap múlva a sejtek 60-80 %-a osztódott. Egy hét múlva kétszeres mennyiségű friss tápoldattal higitottuk a tenyészetet. Két - három hét alatt 60-100 sejtetes kolóniákká fejlődtek.

A kolóniákat ismételt mosás után hormonmentes tápoldatba tettük. A tápoldatot hetente frissre cseréltük, közben a cukorkoncentrációt lépcsőzetesen csökkentettük /0,3 M, majd 0,2 M/, hogy megközelítsük a szélesztéshez használt RM táptalaj ozmolaritását. A kolóniákat végül 0,7 % agarral szilárdított hormonmentes RM táptalajba szélesztettük, kb. 300 cm⁻³ denzitásban. Hat hét után a növekvő kolóniákat friss táptalajra tettük és mint klónokat tartottuk fön.

4.5 Tumorindukció steril növényeken

A steril kulturában tartott növények hajtásának tetejét, ott, ahol még fiatal, levágtuk. A vágott felületre agrobaktérium szuszpenziót cseppentettünk. Három-négy hét múlva a kifejlődött tumorszövetet /1. ábra: 5-15 mm \emptyset / leválasztottuk és antibiotikum tartalmu /Karbenicillin 500 mg dm^{-3} , vankomicin 200 mg dm^{-3} / hormonmentes RM táptalajon neveltünk mindaddig, míg baktériummentessé vált.

4.6 Opinok kimutatása

4.6.1 Oktopin szintáz aktivitás kimutatása

Otten és Schilperoort /1979/ szerint kb. 50 mg szövetet egyenlő térfogatu extrakciós pufferben 0 °C-on homogenizáltunk 1 cm^3 -es eppendorf csőben. Az extrakciós puffer összetétele: 0,1 M trisz-/hidroxi-metil/-amino-metán, 0,5 M szaharóz, 0,1 % L-aszkorbinsav és 0,1 % L-cisztein, pH=8,0. A homogenizátumot eppendorf centrifugában centrifugáltuk és a fölüluszt használtuk. Az oktopin szintáz szubsztrátjait és kofaktorát 0,2 M nátrium-foszfát pufferben /pH 7,0/ oldva frissen kevertük az extraktumhoz. 60 μl extraktumhoz 20 μl 225 mM piruvátot és 20 μl 60 mM redukált nicotinamid-adenin-dinukleotidot /NADH/ adtunk; a keveréket 1 óráig tartottuk szobahőmérsékleten. Az elegyből mintát vettünk /10 μl / és papirelektroforézissel analizáltuk /Whatman 3MM papir zárt dobozban a puffertankok között kifeszítve, 45 perc, 20 V cm^{-1} / hangyasav - 96 %-os ecetsav - víz 5:15:80 elegyben.

Vizuális markerként metilzöld 0,1 %-os etanolos oldatát használtuk /5 ul/. Az alaposan megszárított papirokat fenantrénkinon spray-reagenssel hívtuk elő. A reagenst frissen kevertük 60 %-os etanolban oldott 10 %-os nátrium-hidroxidból és 0,02 % etanolos fenantrénkinonból 1:1 arányban. A papirokat hideg levegőáramban szárítottuk, majd UV fényben /360 nm/ értékeltük. Az arginin és az oktopin sárgászölden fluoreszkál. A metilzöld közvetlenül az oktopin mögött fut.

4.6.2 Agropin és mannopin kimutatás

Leemans et al. /1981/ szerint kb. 50 mg szövetet homogenizáltunk 1 cm^3 -es eppendorf csőben. Ha a szövet nedvességtartalma túl alacsony volt, pár csepp etanolt adtunk hozzá. A homogenizátumot Eppendorf centrifugában centrifugáltuk. A kivonatból mintát vettünk /10 ul/ és papirelektroforézissel analizáltuk /Whatman 3MM papir, 80 perc, 20 V cm^{-1} / az oktopin analízishez használt pufferban. Vizuális markerként Orange G 0,1 %-os etanolos oldatát használtuk /5 ul/. Az agropin és mannopin redukáló tulajdonságuk alapján hívható elő ezüst-nitráttal. A Trevelyan et al. /1950/ által javasolt reagenseket sprayként alkalmaztuk. Az alaposan megszárított papírt először acetonos ezüst-nitráttal kezeltük / $0,1\text{ cm}^3$ telített AgNO_3 + 20 cm^3 aceton + annyi csepp viz, hogy a csapadék feloldódjon/. Az aceton eltávolítása után alkoholos nátrium-hidroxiddal kezeltük a papírt / $0,4\text{ cm}^3$ telített NaOH + 20 cm^3 etanol/. Három - tíz perc alatt sötétbarna foltok

fejlődtek ki ott, ahol redukáló anyag volt. A fölös ezüst-oxidot fotografiai fixáló oldattal távolítottuk el /10 % nátrium-tioszulfát és 1,5 % kálium-metabiszulfit/. Az előhívott papirokat folyóvizben mostuk egy óráig, majd megszáritottuk. Az agropin orange G-hez viszonyított relatív mobilitása mínusz 0,50. A mínusz 0,28 relatív mobilitásu foltban több opin van, közöttük az agropin prekursora, a mannopin /Ellis et al., 1984/.

4.7 DNS izolálás növényi szövetből /Taylor et al., 1983/

Ismert tömegű /10-50 g/ friss szövetet folyékony nitrogénben megfagyasztottunk, majd kávédarálóban finomra őröltünk. Hozzáadtunk 2 % 2-merkaptó-etanol és egyenlő térfogatu, forró kétszeres töménységű extrakciós puffert /1 dm³-ben 20.00 g cetil-trimetil-ammónium-bromid, 12.11 g trisz-OH, 7.45 g Na₂EDTA·2H₂O, 81.80 g NaCl; pH=8.0/. Azonnali keverés után 55 °C-os vízfürdőben tartottuk, amíg hőmérséklete elérte az 50 °C-t. Egyenlő térfogatu kloroform-izoamilalkohol /24:1/ elegyet adtunk hozzá és óvatosan összekevertük. A keveréket centrifugáltuk /10 perc, 4000xg/. A vizes fázist tartottuk meg és hozzáadtunk 1/10 térfogatnyi 10 % cetil-trimetil-ammónium-bromidot /1 dm³-ben 100.0 g CTAB, 40.9 g NaCl/. Megismételtük a kloroform extrakciót. A vizes fázishoz egyenlő térfogatu precipitáló puffert adtunk /1 dm³-ben 10.00 g CTAB, 6.06 g trisz-OH, 3.72 g Na₂EDTA·2H₂O, 1 cm³ 2-merkaptóetanol;

pH=8.0/. A sókoncentráció csökkentése következtében CTAB/nukleinsav csapadék keletkezett. A csapadék leválása szobahőmérsékleten 30 perc után teljes. Összegyűjtöttük a csapadékot centrifugálással, majd cm^3 -enként 1 g cézium-kloridot és 0,5 mg etidium-bromidot tartalmazó TES pufferban /50 mM Trisz-OH, 5 mM Na_2EDTA , 50 mM NaCl, pH=8.0/ oldottuk. A törésmutatót 1,389-re állítottuk be. Az oldatot TV 865-ös vertikális rotorban ultracentrifugába helyeztük /42000 min^{-1} , 24 h/. UV lámpa fényénél összegyűjtöttük a fluoreszkáló DNS-EtBr sávot. A leszívott DNS oldatot kétszeresre hígítottuk TE pufferral /10 mM Trisz-OH, 1 mM Na_2EDTA , pH=8.0/. Az etidium-bromidot izo-amilalkohollal ráztuk ki. A DNS-t kétszeres térfogatu hideg etanollal csaptuk ki. A csapadékot 70 %-os etanollal öblítettük, majd TE pufferban oldottuk. Minusz 20 °C-on tároltuk.

4.8 Escherichia coli plazmid DNS izolálás /Summer-ton et al., 1983/

E. coli baktériumokat 1 dm^3 LB táplevesben neveltünk a megfelelő szelektív antibiotikum jelenlétében /ampicillin 100 mg dm^{-3} / 37 °C-on. Összegyűjtöttük a baktériumokat centrifugálással /4000xg, 10 perc/, szuszpendáltuk 10 cm^3 szaharózos TE pufferban /100 mM Trisz-OH, 100 mM Na_2EDTA , 0,3 g cm^{-3} szaharóz, pH=8.1/, hozzáadtunk 20 ul dietil-pirokarbonátot és inkubáltuk jégen 5 percig. A szuszpenzióhoz 2,5 cm^3 frissen készített lizozim oldatot /6 mg cm^{-3} lizozim vízben/ adtuk.

Óvatos keverés után jégen tartottuk 20 percig. Hozzáadtunk $12,5 \text{ cm}^3$ detergens-só keveréket $/4 \text{ mg cm}^{-3}$ nátrium-dezoxikolát, 10 mg cm^{-3} Brij 58 detergens /Sigma/, $2\text{M NaCl}/$. Alaposan elkevertük spatulával, majd $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -os vízfürdőbe tettük 20 percre. Centrifugáltuk 30 percig $0 \text{ }^\circ\text{C}$ -on $/40000\text{g}/$. A fölülusztót azonnal átöntöttük tiszta edénybe és hozzáadtunk 80 cm^3 NaTCA-etanol elegyet $/4,5 \text{ M}$ nátrium-triklór-acetát és etanol 1:1 arányban elegyítve/. Óvatos keverés után jégen tartottuk egy óráig. A csapadékot centrifugálással összegyűjtöttük $/10\ 000\text{g}$, 20 perc, $0 \text{ }^\circ\text{C}/$, majd öblítettük 80 %-os etanollal. Ultracentrifugálással tisztítottuk. A grádiensen az alsó sáv az intakt plazmid DNS /Radloff et al., 1967/.

4.9 DNS emésztés restrikciós endonukleázokkal

A restrikciós endonukleázokat a Reanal-tól vásároltuk. Az EcoRI, BamHI és PstI enzimeket használtuk $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, a következő pufferekben. EcoRI: 100 mM Trisz-OH, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 100 ug cm^{-3} zselatin, 7 mM 2-merkaptó-etanol, $\text{pH}=7.5$. BamHI: 10 mM Trisz-OH, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 100 ug cm^{-3} zselatin, 7 mM 2-merkaptó-etanol, $\text{pH}=7.9$. PstI: 10 mM Trisz-OH, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 100 ug cm^{-3} zselatin, 7 mM 2-merkaptó-etanol, $\text{pH}=7.4$. A reakciókat $1/10$ térfogat stop pufferral állítottuk le. A stop puffer összetétele 100 mM Na_2 EDTA, 50% glicerin, $0,25 \%$ brómfenolkék, $\text{pH}=8.0$ /Maniatis et al., 1982/.

4.10 Gélelektroforézis és a DNS kötése nitrocellulóz filterre /Southern blot/

A DNS fragmenteket horizontális 5x150x200 mm 0,7 % agaróz /Type I, Sigma/ gélben TEA pufferban /40 mM Trisz-OH, 20 mM ecetsav, 2 mM Na₂ EDTA, pH=8.1/ választottuk el /Chilton et al., 1977/. A gél anyagát 0,2 mg dm⁻³ etidium-bromiddal festettük. Az elektroforézist 4 °C-on kb. 18 óráig végeztük /2 V cm⁻¹/. A fragmentek méretének meghatározásához standardként PstI enzimmel emésztett lambda fág DNS-t /Reanal/ futtattunk párhuzamosan.

Az agaróz gélből a DNS fragmenteket denaturálás /15 perc, 1,5 M NaCl és 0,5 M NaOH tartalmu oldatban/ és semlegesítés /15 perc, 3 M NaCl és 0,5 M Trisz-HCl tartalmu oldatban, pH=7.0/ után átszivattuk nitrocellulóz filterre. Southern /1975/ szerint 20xSSC oldatot /3 M NaCl és 0,3 M nátrium-citrát/ használtunk. A gélt szűrőpapírra /Whatman 3MM/ helyeztük, majd a géltre 20xSSC oldattal nedvesített nitrocellulóz filtert /Schleicher és Schüll, BA85/ helyeztünk. A folyadékot alulról, tankból szivattuk a filterre helyezett szűrőpapírral és papírtörölközőkkel egy napig. A filtert alaposan öblítettük 2xSSC-ben, majd fölhasználás előtt 80 °C-on 2 óráig vákuumban szárítottuk.

4.11 A DNS jelölése rádióaktív foszforral

Feinberg és Vogelstein /1983/ alapján a 25 ul-es reak-

cióelegy: 12 ul denaturált DNS /60 ng, TE pufferban forralva 5 percig/, 11,5 ul LS koktél, 1 ul 10 mg cm⁻³ zselatin, 0,5 ul /2 enzimegység/ DNS polimeráz I nagy fragment /Jacobson et al., 1974/, 2 MBq/~~μ~~-³²P/dATP/dezoxi-adenozin-trifoszfát, 13 TBq/mmol, liofilizálva, ELTE Izotóp Intézete/. Az LS koktél összeállítása: 25 ul 1 M 4-/2-hidroxi-etil/-1-piperazin-etánszulfonsav /pH=6.6/, 25 ul DTM oldat és 7 ul OL oldat. A DTM oldat: 250 mM Trisz-HCl, 25 mM MgCl₂, 50 mM 2-merkapto-etanol, 100 μM dGTP, dCTP és dTTP, külön-külön, pH=8.0. Az OL oldat: 1 mM Trisz-OH, 1 mM Na₂EDTA, pH=7.5, és 90 optikai denzitás egység oligodezoxiribonukleotid cm³-enként. A reakcióelegyet 5-8 óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 25 ul fenollal állítottuk le a reakciót. A jelölt DNS-t a be nem épült dATP-től Sephadex G-50 Fine oszlopon /5 cm³/ szeparáltuk TES pufferral.

4.12 DNS-DNS molekuláris hibridizáció és autoradiográfia

A filtereket 2xSSC-ben megnedvesítettük, polietilén tasakba helyeztük, majd előhibridizációs oldattal /20 cm³ egy 13x13 cm filterre/ leforrasztottuk és 68 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át. Az előhibridizációs oldatösszetétele /Zambryski 1982/ 3xSSC és 1xDenhardt keverék. A Denhardt oldat: 0,02 % Ficoll 400 /Pharmacia/, 0,02 % polivinil-pirrolidon /Sigma/ és 0,02 % bovine serum albumin /Denhardt, 1966/. Az előhibridizációs oldat eltávolítása után a filterre rá-

öntöttük a hibridizációs koktélt: 3xSSC, 1xDenhardt keverék, 1 mM Na₂EDTA /pH=8.0/, 0,5 % nátrium-lauril-szulfát /SDS/, 10 % nátrium-dextrán-szulfát /Sigma/ Wahl et al. /1979/ szerint, a denaturált /10 perc forralás/ rádioaktívan jelzett próba DNS. A tasakot buborékmentesen zártuk és 48 óráig inkubáltuk 68 °C-on. A filtert a hibridizáló oldat eltávolítása után négyszer mostuk /68 °C, 15 perc/ 3xSSC és 0,5 % SDS-ben, egyszer /68 °C, 15 perc/ 1xSSC és 0,5 % SDS-ben. A filtert végül szobahőmérsékleten öblítettük 2xSSC-ben, majd szárítottuk.

Az autoradiográfiát -70 °C-on, ólomkazettában végeztük. Medifort RP filmet és DuPont erősítőket használtunk.

5 KISÉRLETI EREDMÉNYEK

5.1 Nicotiana plumbaginifolia protoplasztok tenyésztése Agrobacterium tumefaciens-szel különböző hormonösszetételű tápoldatokban

Összehasonlítottuk a Nicotiana plumbaginifolia protoplasztok osztódási gyakoriságát különböző hormonösszetételű 0,4 MSzK₃ tápoldatokban. A laboratóriumunkban a tenyésztéshez használt /Nagy és Maliga, 1976; 2. Táblázat, 7. variáció/ és egy, az irodalomban javasolt /Müller et al., 1983; 2. Táblázat, 5. variáció/ hormonkombináción kívül kipróbáltuk egy másik faj, a N. tabacum Agrobacterium-transzformációhoz használt /Márton et al., 1979/ alacsony hormonszintű táptalajt /2. Táblázat, 8. variáció/. Teszteltünk továbbá olyan táptalajokat, amelyek a hormonokat köztes, vagy szélsőséges koncentrációban tartalmazták /2. Táblázat/. Tartós osztódást csak ott kaptunk, ahol auxin /2,4-D és/vagy NAA/ és citokinin /BA/ is volt a táptalajban. A kedvezőtlenebb hormonkombinációk esetén a protoplasztok csak kis hányada osztódott, a többi megnyult vagy megnagyobbodott. A sejtmegnyulás jellemző volt a sok auxint tartalmazó /2. Táblázat 11-12. variációk/ tápoldatokban. Ez a sejtfal legalább részleges regenerálódását bizonyítja; azonban a protoplasztok csak kis hányadára volt jellemző.

Az együtt-tenyésztéses /"co-culture"/ transzformációhoz a hormonmentes tápoldaton /2. Táblázat, 13. variáció/ kívül, a legnagyobb osztódási gyakoriságot biztosító 5. és 7.,

a köztes mennyiségű hormont tartalmazó 4. és 6., valamint a csak auxint /10./ és a csak citokinint /1./ tartalmazó tápoldatokat választottuk ki /2. Táblázat/. A protoplasztokat hormonmentes tápoldatban izoláltuk.

2. Táblázat: Nicotiana plumbaginifolia protoplasztok osztódása különböző hormonok jelenlétében

| Sor- szám | BA | Hormon /mg dm ⁻³ / | | Osztódás gyakorisága ^a |
|--------------|-----|-------------------------------|-------|--------------------------------------|
| | | NAA | 2,4-D | |
| 1. | 2,0 | - | - | - |
| 2. | 1,0 | - | - | - |
| 3. | 1,0 | 0,1 | - | 5 % |
| 4. | 1,0 | 1,0 | - | 40 % |
| 5. | 1,0 | 3,0 | - | 65 % |
| 6. | 0,1 | 1,0 | - | 23 % |
| 7. | 0,2 | 1,0 | 0,1 | 77 % |
| 8. | 0,2 | 0,1 | - | 1 % |
| 9. | - | 1,0 | - | - |
| 10. | - | 2,0 | - | - |
| 11. | - | 5,0 | - | 1 % ^e |
| 12. | - | 10,0 | - | 1 % ^e |
| 13. | - | - | - | - |

^aAzon sejtek relatív gyakorisága, amelyek egy héten belül osztódtak.

^bBA = N⁶-benzil-adenin

^cIAA= 1-naftil-ecetsav

^d2,4-D = 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav

^eEgy hétnél később osztódtak és legfeljebb kétszer.

Az agrobaktériumok hozzáadása után a növényi sejtek összezsapódnak, mivel a baktériumok hozzákötődnek a sejt-falhoz és cellulózszálakat is szintetizálnak /Matthysse, 1983/, amelyekkel a sejteket összefogják. Az előkísérletek során azt tapasztaltuk, hogy ez a hatás a friss protoplasztoknál alig jelentkezik, míg a három napos sejteknél már olyan erős az inkubációs idő végére, hogy csak újabb protoplasztálással lehet a sejteket szétválasztani. Ezt azonban a növényi sejtek többsége nem bírta ki. A friss protoplasztok esetében az összezsapódást meg lehetett szüntetni egy néhány órás celluláz kezeléssel. A különböző hormonkombinációk összehasonlításakor ezért friss protoplasztokhoz adtuk a baktériumokat. A baktériumkezelés és mosás után az eredeti protoplasztszám 50-60 %-kal csökkent.

Az Agrobacterium tumefaciens LBA 4013 az az oktopin-típusu törzs, amely a leghatékonyabbnak bizonyult a N. tabacum egysejtes transzformációs rendszerben /Márton et al., 1979/. Az LBA 4011 törzs pedig lényegében az előbbi Ti-plazmidtól mentes változata /1. Táblázat/, amelyet kontrollként használtunk.

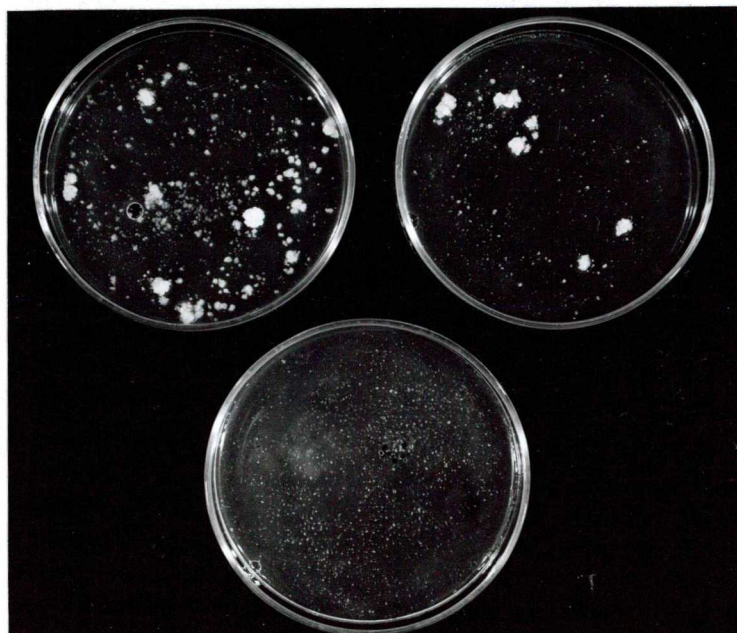
A baktériumkezelés után a sejteket ugyanolyan tápoldatban tenyésztettük, mint amilyenben a kezelést kapták. A sejtek az auxint és citokinint is tartalmazó 4., 5., 6. és 7. tápoldatokban /2. Táblázat/ 3-5 nappal a baktériumok eltávolítása után osztódtak. Az osztódás gyakorisága 60-80 % között volt. Hasonló, kb. 60 % gyakorisággal osztódtak azok a sejtek is, amelyeket a 2 mg dm^{-3} NAA-t tartalmazó /2. Táblázat, 10. variáció/ tápoldatban virulens LBA 4013 baktériumokkal tenyésztettünk együtt. Ugyanakkor az LBA 4011 baktériummal

kezelt sejtek nem osztódtak, csak megnyultak, vagy megduzzadtak. Hasonló sejtalakváltozások voltak megfigyelhetők a hormonmentes tápoldatban mindkét típusu baktérium eltávolítása után.

Az osztódó sejtekből 2-3 hét alatt 60-100 sejtes kolóniák fejlődtek. Ebben a stádiumban kezdtük meg a hormonautotróf kolóniák szelektálását. Hormonmentes tápoldatban a normál kolóniákban az osztódás leállt, a sejtek jelentősen megduzzadtak és megnyultak. Egyes kolóniákban embryoidok képződtek, amelyek egy része azonban az ozmolaritás csökkenése során dezorganizálódott. A kolóniákat végül agarral szilárdított hormonmentes táptalajba szélesztettük 300 cm^{-3} denzitásban. E denzitás fölött nem bizonyult szelektívnek a táptalaj, mivel a sejtek duzzadása tovább folytatódott és az osztódó kolóniákat nem lehetett azonosítani. Négy-hat hét után a növekvő kolóniákat /2-10 mm ϕ , 3. ábra/ áttettük friss hormonmentes táptalajra és mint klónokat tartottuk fenn.

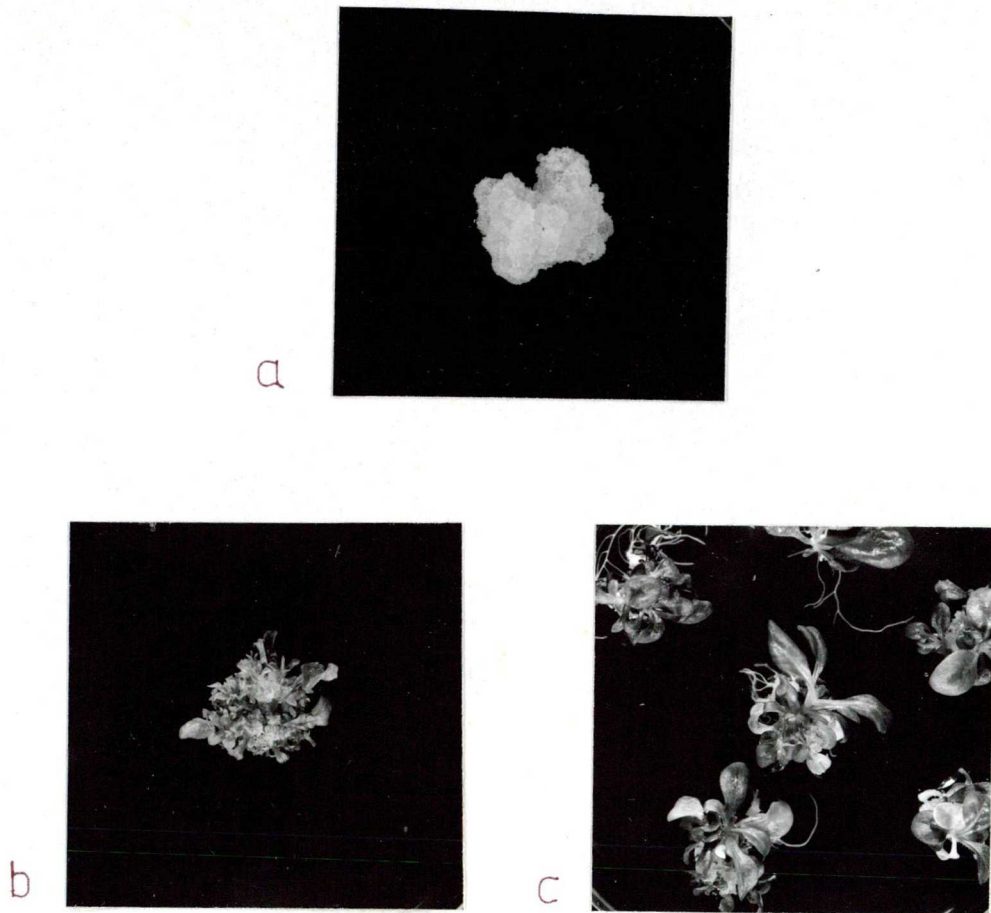
5.2 Hormonautotrófia és oktopin szintáz a szelektált klónokban

A szelektált klónokat a hormonmentes táptalajon mutatott növekedés alapján 3 típusba lehetett sorolni: egynemű kallusz /4. ábra, a/, hajtásokat regeneráló kallusz /4. ábra, b/ és gyökeres növény /4. ábra c/. Az utóbbi típus a szelekció során, mint viszonylag kicsi, zöld kolónia jelentke-



3. Ábra: Hormonautotróf kolóniák szelekciója hormonmentes táptalajban. Felső sor: hormonautotróf módon növekvő kolóniák az LBA 4013 /virulens/ törzsszel kezelt tenyészetekben. Alsó sor: LBA 4011 /avirulens/ törzsszel kezelt tenyészet.

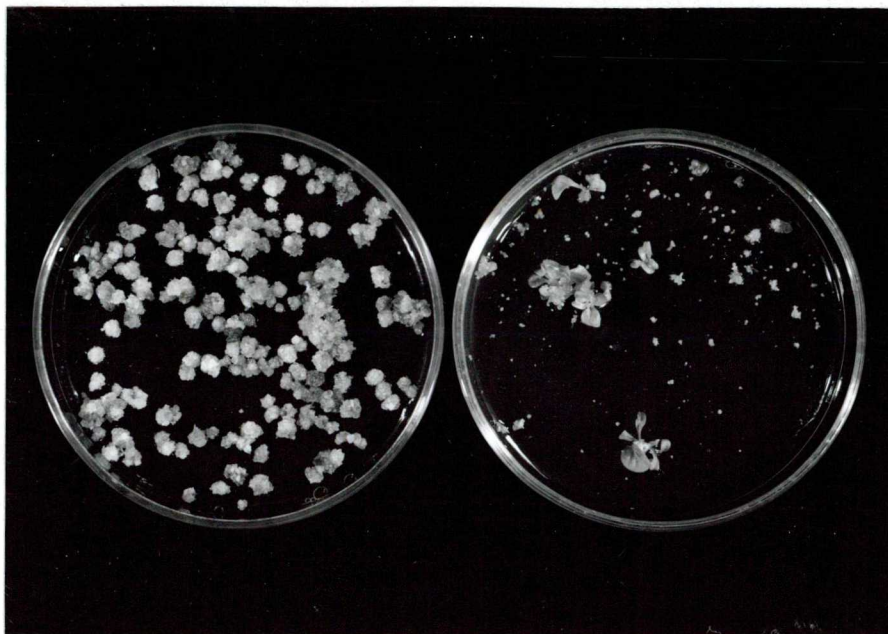
zett, majd az ismételt átoltások során fokozatosan differenciálódott gyökeres növényé. Ezeket a sejtvonalakat hormonmentes táptalajon növényként, vagy hormonokkal kiegészített táptalajon /RMOP/ kalluszként tartottuk fenn. A nem hormonautotróf N. plumbaginifolia szövetek jellegzetessége, hogy a kallusz inokulumok hormonmentes táptalajon vagy elpusztulnak, vagy a szövet egy részéből gyökeres növények



4. Ábra: Különböző morfológiájú szelektált sejtvonalak hormonmentes táptalajon. a, egynemű kallusz; b, hajtásokat regeneráló kallusz; c, nem hormonautotróf szövetből regenerálódott növény.

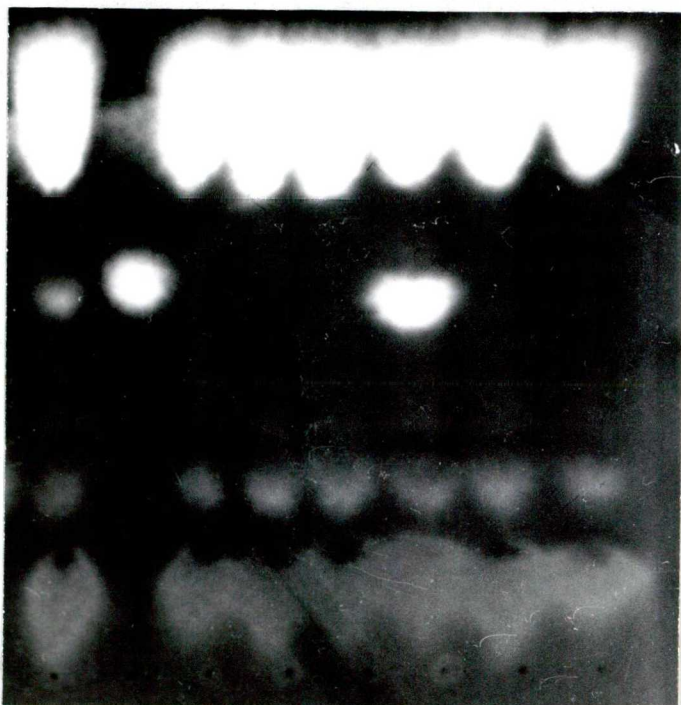
regenerálódnak /5. ábra/.

A hormonautotrófiáért felelős gének mellett a TL-DNS-en van az oktopin szintáz génje /2. ábra/. Minden egyes klónt, amelyet a virulens LBA 4013 baktériumokkal végzett együtt-tenyésztés után kaptunk, megvizsgáltunk, hogy kimutatható-e benne oktopin szintáz aktivitás /6. ábra/. A 3. táblázatban összefoglaltuk a különböző hormonösszetételű táptalajokban végzett együtt-tenyésztés után /LBA 4013 törzsszel/ a szelektált, a stabil hormonautotróf és az oktopin szintáz-pozitív



5. Ábra: Nicotiana plumbaginifolia sejtkolóniák növekedése hormonokkal kiegészített táptalajban /baloldalt/. Hormonmentes táptalajon egyes kolóniákból növények regenerálódnak /jobboldali kép/.

klónok számát. A kontrollként használt LBA 4011 avirulens törzssel kezelt protoplastokból nem, vagy csak nagyon kevés hormonautotróf kolóniát kaptunk. A 6. hormonkombináció /2. Táblázat/ alkalmazásakor 27 600 hormonmentes táptalajba szélesztett kolónia között 2 stabil hormonautotróf kolónia / $7,24 \times 10^{-5}$ / volt. Mindkettő a hajtásregeneráló kallusz típusba tartozott, és oktopin szintáz aktivitás nem volt kimutatható.



6. Ábra: Oktopin szintáz aktivitás kimutatása. Fenantrenkinon reagenssel előhívott papirelektroferogram. 1. N. plumbaginifolia növényen kiváltott tumor; 2. Szintetikus oktopin; 3-8. Szelektált sejtvonalak.

A legtöbb stabil hormonautotróf, illetve oktopin szintáz pozitív klónt az $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ NAA és $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$ BA hormonkombináció alkalmazásával kaptuk. Ez az érték kb. 15-ször akkora, mint amit az $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ NAA és $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ BA hormonkombinációval értünk el. A transzformáció gyakorisága az auxin/citokinin arány növekedésével párhuzamosan nőtt. Ebbe a sorba nem illeszthető be a csak NAA-t tartalmazó táptalaj, de magas transzformációs gyakoriságot biztosított /3. Táblázat/.



3. Táblázat: A transzformáció gyakorisága a Nicotiana glumbaginifolia-Agrobacterium tumefaciens LBA 4013 egysejtes transzformációs rendszerben különböző hormonok jelenlétében.

| Hormon /mg dm ⁻³ / | | | H /-/ ^a táp- talajba | Nö- vek- vő | Stabil H /+/ ^b /db/ | OS /+/ /db/ | Transzfor- máció gya- korisága ^d |
|----------------------------------|-----|-------|---------------------------------------|----------------------|--------------------------------------|----------------|---|
| BA | NAA | 2,4-D | szélesz- tett ko- lónia,db | ko- ló- nia,db | | | |
| 1,0 | 1,0 | - | 48 600 | 10 | 9 | 7 | 1,85x10 ⁻⁴ |
| 1,0 | 3,0 | - | 24 800 | 27 | 12 | 11 | 4,83x10 ⁻⁴ |
| 0,2 | 1,0 | 0,1 | 30 000 | 53 | 36 | 31 | 1,20x10 ⁻³ |
| 0,1 | 1,0 | - | 37 200 | 146 | 112 | 101 | 3,01x10 ⁻³ |
| - | 2,0 | - | 54 300 | 198 | 125 | 95 | 2,30x10 ⁻³ |

^a H /-/ = hormonmentes táptalaj

^b H /+/
= hormonautotróf

^c OS/+/
= oktopin szintáz pozitív

^d A transzformáció gyakoriságát a stabil hormonautotróf klónok és a hormonmentes táptalajba szélesztett kolóniák számának arányával becsültük.

5.3 Agropin és mannopin a szelektált klónokban

A 2 mg dm⁻³ NAA alkalmazásakor kapott klónok száma elég nagy volt ahhoz, hogy megvizsgálhassuk minden egyes, az oktopin-típusú baktériumokra jellemző tumormarker előfordulását. Mind a 198 szelektált klónt megvizsgáltuk, hogy tar-

talmaznak-e agropint és mannopint - a TR-DNS markereit.

Az agropin és a mannopin igen nagy mennyiségben termelődik a transzformált szövetekben /Firmin és Fenwick, 1978/ és ki is választódik. Könnyen detektálhatók voltak a szövet környezetében a táptalajban. Ha a transzformált szöveteket normál szövetekkel tartottuk együtt ugyanabban a petricsészében, akkor pár hét múlva agropint és mannopint lehetett kimutatni a normál szövetekben is. A tesztelendő klónokat ezért egymástól elkülönítva tartottuk fenn.

A 4. táblázat mutatja a TL és TR-DNS markerek megoszlását a transzformánsokban. A szelektált klónoknak csak 64 %-a mutatott valamilyen tumormarkert; a fennmaradó 36 %-ba az opinokat nem tartalmazó, gyökeres növények tartoztak, amelyeket kallusz formában csak hormontartalmu táptalajon lehetett fönntartani.

4. Táblázat: TL- és TR-DNS markerek megoszlása a szelektált klónokban A. tumefaciens LBA 4013 kezelés után

Klónok száma, amelyek:

| H/+/ | H/+,OS/+/ ^b | H/+,OS/+,MAN ^c | H/+,OS/+, MAN, MAN,AGR | AGR |
|------|------------------------|---------------------------|---------------------------|-----|
| 30 | 84 | 3 | 8 | 1 |

^a H/+/ = hormonautotróf; ^b OS/+/ = oktopin szintáz-pozitív;
^c MAN = mannopin; ^d AGR = agropin.

A legtöbb transzformánsra csak a TL-DNS markerek, hor-

monautotrófia és oktopin szintáz volt jellemző. Jóval kevesebb volt azoknak a száma, amelyekben a TL-DNS markereken kívül agropint és mannopint - TR-DNS markereket - is sikerült kimutatni. Találtunk egy olyan klónt is, amelyben csak a TR-DNS jelenlétére jellemző agropin és mannopin volt /7. ábra/. Ez a 101 számú transzformált sejtvonal, amely nem volt hormonautotróf.



7. Ábra: Mannopin és agropin detektálása papirelektroferogrammon alkálikus ezüst-nitrát reagenssel. A: nem migráló redukáló anyagok a startponton; B: mannopin; C: agropin. 1. Normál N. plumbaginifolia kallusz. 2-3. LBA 4013-as törzsszel kiváltott tumor. 4. 101-es klón /LBA 4013/. 5. 473-as klón /LBA 4013/. 6. A281-es törzsszel kiváltott tumorok. 7. 107-es klón /A281/. 8. 65-ös klón /A281/.

Nemcsak a TR- és a TL-DNS-re külön-külön jellemző markeregységek váltak el, hanem az egyes markeregységek sem jelentkeztek mindig teljes számban. Egyes hormonautotróf sejtvonalakból ugyanis minden opin hiányzott. Más, opinokat tartalmazó klónok teratómaszerű hajtásokat regeneráltak, tehát a hajtásregeneráció gátlásáért felelős onkogének a TL-DNS-en inaktívak voltak, vagy hiányoztak.

A TR-DNS markerek kifejeződésében is találtunk eltéréseket: összesen 11 klónban volt mannopin, de csak 8 klónban volt mellette agropin is /7. ábra/. A növényekről frissen lezedett tumorszövet mindig tartalmaz mannopint és agropint is /Dahl et al., 1983/, azonban a legtöbb szövetből eltűnnek ezek a vegyületek, a hosszabban tartó szövettenyésztés során. Agropint nem, de mannopint tartalmazó tumorvonalakat sikerült növényen kiváltott tumorokból is előállítani /7. ábra/.

Az agropin és mannopin markereknek ezt a sajátos viselkedését alkalmunk nyílt tanulmányozni más típusú transzformációkban is. A leucinopin-típusú A281 törzs hasonló az oktopin-típusú törzsekhez abban a tekintetben, hogy az általa kiváltott tumorokban is van agropin és mannopin. Haploid N. plumbaginifolia protoplasztokat tenyésztettünk együtt A281 baktériumokkal 2 mg dm⁻³ NAA-t tartalmazó tápoldatban, majd az előzőekben leírt módon szelektáltuk a hormonautotróf klónokat és kerestük bennük a mannopint és az agropint. A hormonmentes táptalajba 21 500 kolóniát szélesztettünk, 153 növekedett, de csak 92 volt stabil hormonautotróf. Agropint és mannopint

csak kevés klónban találtunk. Az agropin itt is hiányzott a mannopin mellől egyes klónokban /5. Táblázat, 7. ábra/.

5. Táblázat: Hormonautotrófia, agropin és mannopin a szelektált klónokban. A.tumefaciens A281 kezelés után

Klónok száma, amelyek:

| H/+/ ^a | H/+/, MAN ^b | H/+/, MAN, AGR ^c |
|-------------------|------------------------|-----------------------------|
| 77 | 4 | 11 |

^a H/+/ = hormonautotróf; ^b MAN = mannopin;

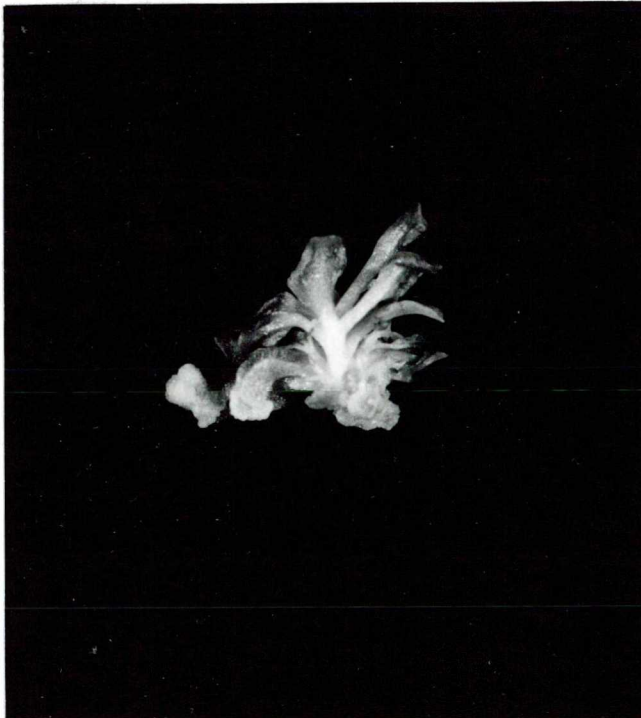
^c AGR = agropin.

Hasonlóképpen az oktopin-típusu törzsekhez, az A281 törzs is olyan tumorokat okoz, amelyekben az agropin és a mannopin általában csak addig van, amíg nem kerül szövettenyészetbe a tumor. Agropint nem, de mannopint tartalmazó tumorvonalakat ugyancsak sikerült előállítani, a növényen kiváltott tumorokból is /7. ábra/.

5.4 Növényregeneráció a transzformált sejtvonalakból, a TR-DNS markerek öröklődése

Az oktopin szintáz-pozitív klónok mindegyike hormonautotróf volt, a regeneráló típusu kalluszokról leválasztott hajtásokból nem fejlődött gyökeres növény; ezek a transzformált hajtások nem mutattak apikális dominanciát

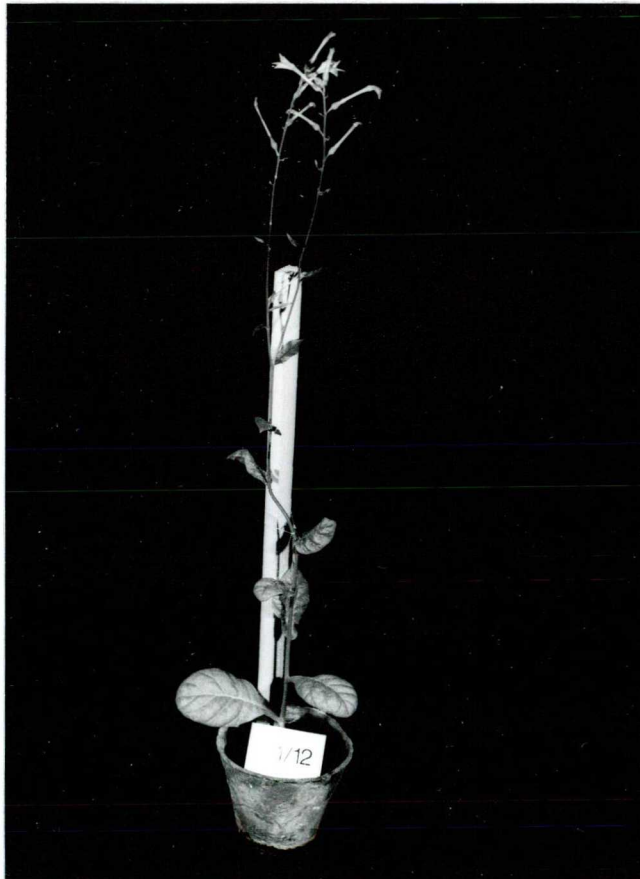
és az alapjukon gyökér helyett hormonautotróf kalluszt fejlesztettek /8. ábra/. A 101-es klón, amely a TL-DNS markereket nem, hanem csak a TR-DNS markereket hordozta, gyökeres növényeket regenerált /4. ábra, c/. Mind a 32 regenerált növény tartalmazott agropint és mannopint is.



8. Ábra: Teratóma hajtás, amely gyökerek helyett hormonautotróf kalluszt fejleszt hormonmentes táptalajon.

Valamennyi regenerált növény kromoszómaszáma 40, vagy közel annyi /36-39/ volt, amely megfelel a tetraploid értéknek. Néhány tetraploid kromoszómaszámu növényt kiültettünk az üvegházba, ahol virágoztak és magokat is hoztak. Az agro-

pint és a mannopint tartalmazták a gyökérben, a levélben és a virágokban is. A vad-típusú diploid növényektől morfológiailag alig tértek el. A növény és a virágok valamivel nagyobbak voltak /9. ábra/, de ugyanakkor a toktermés kisebb volt a gyenge magkötés miatt. A magkötés a vad-típusúhoz képest ötször gyengébb volt, ennek megfelelően a magok nagyobbak voltak. Nem kaptunk magot, ha a transzformált növényekkel poroztuk be a vad-típusú diploid növényeket. Normális mennyiségű magot nyertünk azonban a transzformált növényeken, ha vad-típusú diploid növényekkel poroztuk be azokat. Ezeknek a magoknak a csirázási erélye csak 5-15 % volt, szemben az önbeporzásból nyert magok 95-100 %-os csirázási erélyével.



9. Ábra: A 101-es sejtvonalból regenerált 12-es számú növény. Minden részében agropint és mannopint tartalmaz.

Ugyanezek a morfológiai és termékenységi eltérések jellemzők a nem transzformált tetraploid N. plumbaginifolia növényekre is, amelyeket szövettenyészetből regeneráltak.

A transzformált növények felülfertőzhetőek voltak. Az LBA 4013 törzssel beoltva hormonautotróf, oktopin szintáz-pozitív, agropin és mannopin tartalmazó tumorszövet fejlődött rajtuk.

Az önbeporzásból és a keresztezésből nyert magok egy részét steril körülmények között csiráztattuk, majd a csiranövényeket elkalluszosítottuk, más részét üvegházban csiráztattuk. A csiranövényeket, illetve a kalluszokat analizáltuk agropinra és mannopinra. A táptalajon nevelt kalluszokban az agropin és a mannopin koncentrációja sokkal nagyobb volt, mint az üvegházi anyagban, feltehetően azért, mert a glükóz mint prekursor /Firmin és Fenwick, 1978/ nagy mennyiségben rendelkezésre állt. Az üvegházban nevelt csiranövényekben olyan vegyületek is voltak, amelyek zavarták az agropin és mannopin kimutatását. Ezért elkalluszosított csiranövényekkel dolgoztunk tovább.

Az önbeporzás útján nyert nemzedékben 3:1 hasadást, míg a keresztezésben közel 1:1 hasadást kaptunk /6. Táblázat/.

6. Táblázat: Agropin és mannopin a 101-es sejtvonalból regenerált növények utódaiban.

| Nemzedékek | Vizsgált csiranövény, db | Agropin és mannopin tartalmaz, % |
|--|--------------------------|----------------------------------|
| <u>101/13</u> ^a önbeporzás | 205 | 71 |
| <u>101/15</u> önbeporzás | 111 | 76 |
| <u>101/16</u> önbeporzás | 105 | 78 |
| <u>101/13</u> x vad-típus ^b | 40 | 43 |

^a101/13 = A 101-es sejtvonalból regenerált 13. számú növény;

^bVad-típusú diploid N. plumbaginifolia.

5.5 A T-DNS szerkezetének vizsgálata a 101-es sejtvonalba DNS-DNS molekuláris hibridizációval

A 101-es sejtvonala csak TR-DNS markereket hordozott, feltehetően tehát nem volt benne TL-DNS. Hogy ezt bizonyítsuk, DNS-DNS hibridizációval megvizsgáltuk, hogy mely T-DNS szakaszok vannak jelen. A szövetből DNS-t tisztítottunk, amit EcoRI restrikciós endonukleázzal hasítottunk. A DNS fragmenteket elektroforetikus elválasztottuk agaróz gélben, majd denaturálás után nitrocellulóz filterre kötöttük. Próbaként a pTiAch5 tumorindukáló-plazmid T-régiójának klónozott és ³²P-ral jelölt fragmentjeit használtuk.

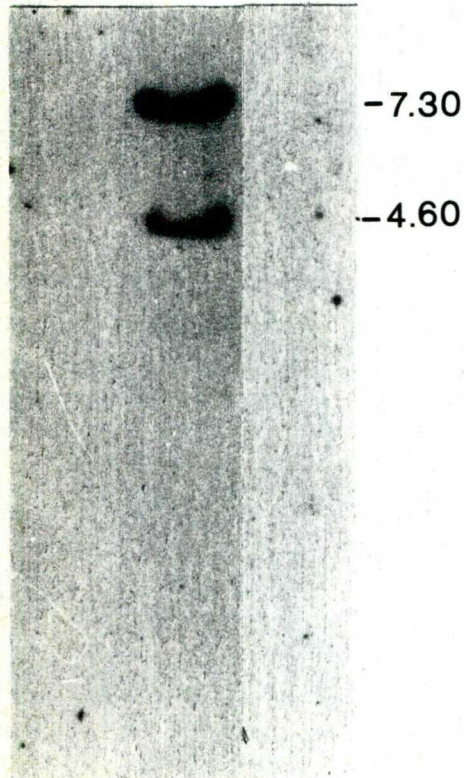
Negatív kontrollként vad-típusú növényekből izolált DNS-t használtunk. A hibridizáció belső kontrollja egy olyan keverék volt, amely EcoRI enzimmel emésztett vad-típusú növényi és BamHI enzimmel hasított pGV0153 plazmid DNS-ből állt. A keverési arány megfelelt annak, mintha a N. plumbaginifolia haploid genomjában a pGV0153 egy kópiában fordulna elő. A pGV0153 plazmid /1. Táblázat/ a TL-DNS bal felét tartalmazza /10. ábra/.

Ha a pGV0153 plazmidot használtuk próba DNS-ként, akkor nem kaptunk hibridizációt /11. ábra/. TL-DNS bal felének megfelelő szekvencia tehát nem fordul elő sem a vad-típusu, sem a 101-es sejtvonalban.

A pGV0120 plazmid /1. Táblázat/ a TR-régiót fedi át /10. ábra/. A rádióaktív próba két hibridizáló sávot hívott elő /11. ábra/. Az egyik mérete alapján megfelel a TR-régió EcoRI 12-es belső fragmentjének /10. ábra/. A másik fragment mérete kb. 2,45 kilobázis.

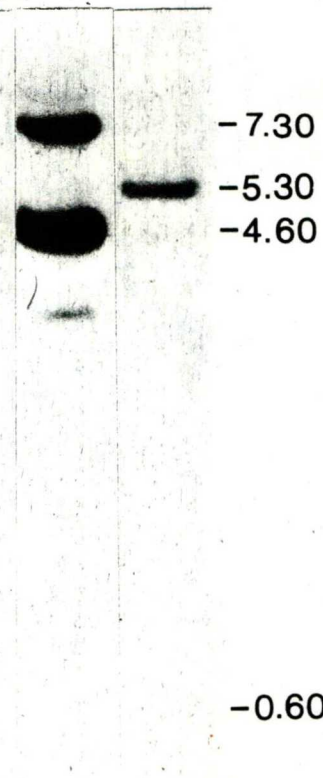
A pGV0201 plazmid /1. Táblázat/ a TL-régió jobb és a TR-régió bal felét fedi át /10. ábra/. Ennek megfelelően ez is előhívta az 5,30 kb. nagyságu EcoRI 12-es fragmentet /11. ábra/. Hibridizált továbbá egy kb. 0,60 kilobázis nagyságu fragment, amely feltehetően a TR-DNS növényi DNS szekvenciához kapcsolt baloldali határának felel meg. A 2,45 kilobázis nagyságu hibridizáló fragment viszont a TR-DNS növényi DNS szekvenciához kapcsolódó jobboldali határa lehet /10. ábra/. A DNS-DNS molekuláris hibridizáció és az agropin szintetizáló képesség révén azonosított T-DNS a 10. ábrán látható /b/.

Próba: pGV 0153



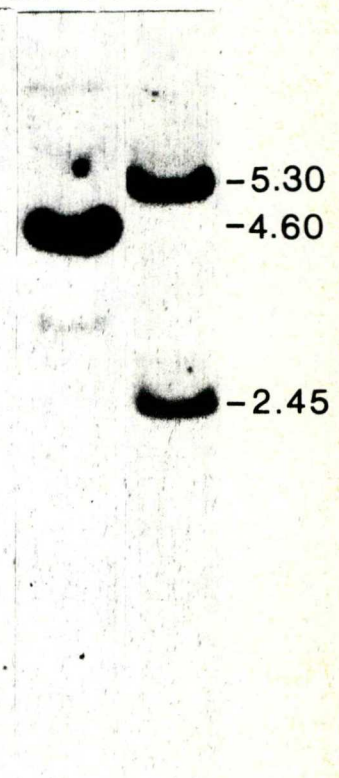
1 2 3

pGV 0201



4 5 6

pGV 0120



7 8 9

11. Ábra: DNS-DNS molekuláris hibridizáció autoradiogramja. 1,4 és 7. *EcoRI* restrikciós endonukleázzal emésztett DNS vad-típusu *N. plumbaginifolia* kalluszból. 2,5 és 8. *EcoRI* enzimmal emésztett DNS vad-típusu *N. plumbaginifolia* kalluszból +1 kópiának megfelelő, *BamHI* enzimmal emésztett pGV0153-as plazmid. A számok a sávok mellett a fragmentek becsült méretei kilobázispárban megadva. A 4.60 kbp nagyságu sáv a pBR322 plazmid. 3,6 és 9. *EcoRI* enzimmal emésztett DNS a 101-es sejtvonalból.

6. MEGVITATÁS

Az agrobaktériummal transzformált sejtek hormonauto-trófiája egy természetes, domináns, szelektálható marker. Ez volt az alapja az egysejtes transzformációs rendszerek kifejlesztésének Nicotiana tabacum /Márton et al., 1979/, Petunia /Jia et al., 1983/ és Hyoscyamus /Hanold, 1983/ növényekben. A hormonautotróf kolóniák szelekciója révén haploid és diploid Nicotiana plumbaginifolia protoplasztokból egyaránt nagyszámu transzformált sejtvonalat kaptunk. Az agrobaktérium kezelés megnövelte a protoplasztok osztódási gyakoriságát azokban a táptalajokban, amelyek a növényi hormonokat nem optimális mennyiségben tartalmazták. Különösen szembetűnő volt ez a hatás a csak auxint tartalmazó táptalajban, de csak a virulens, Ti-plazmidot hordozó, baktériumok esetében. Itt ugyanis a virulens baktériumokkal történt kezelés után a protoplasztok nagy gyakorisággal osztódtak és kolóniákat képeztek. A protoplasztok a sejtosztódáshoz szükséges citokinineket feltehetőleg a baktériumoktól kapták. Citokininek szabadulnak föl a degradálódó transzfer RNS-ekből is /Cherayil és Lipsett, 1983; Palni és Horgan, 1983/, de a virulens törzsek aktiv citokinin kiválasztást mutatnak /Weiler et al., 1981/. A baktériumok eltávolítása után a sejtek tartós osztódását a transzformált sejtek citokinin túltermelése biztosíthatta /Ooms et al., 1981/.

A növényi sejtek kompetenciája a transzformációra átmeneti jellegű. Kalanchoe növényeken ez a sebzési válasz



során az első mitózishullám előtti periódus /Braun, 1962/. Hasonlóképpen a N. tabacum protoplasztok is az első osztódás előtt a legfogékonyabbak a transzformációra /Márton et al., 1979/. A sejtfal regenerációján kívül /Márton et al., 1979; Wullems et al., 1981a; Krens et al., 1983/ hangsúlyozták az aktiválódott sejtciklus egyéb folyamatainak fontosságát is /Fizoozabady és Galbraith, 1984/. Kísérleteinkben frissen izolált protoplasztokat használtunk, amelyek az inkubációs periódus alatt a sejtfalukat legalábbis részben regenerálták. Ugyanakkor ismert az is, hogy a L. plumbaginifolia protoplasztok sejtciklusa nagymértékben szinkronban van és a sejtek többsége az izolálás utáni 20. órában belép az S fázisba, a DNS szintézist megkezdi /Magnien és Devreux, 1980/. A sejtciklus aktiválódásában az auxinoknak az első pillanattól kezdve sokrétű szerepe van /Mayer és Cooke, 1979; Kahl, 1982/, míg a citokininek fontossága a mitotikus apparátus képződésekor kerül előtérbe /Jouanneau és Marsac, 1973/. Ezzel van összhangban az, hogy az egysejtes transzformációs rendszerünkben a tápoldatban az auxin/citokinin arány növelésével párhuzamosan nőtt a transzformáció gyakorisága. Végző soron a tápoldatban az auxin/citokinin arány, a baktériumokból felszabaduló növényi hormonhatású anyagok által módosítva, hatott a sejtciklus aktiválódására és ezen keresztül a transzformáció iránti fogékonyságra. Növényi hormonoknak a tumorfejlődésre gyakorolt hatását vizsgálva korábban csak vagy nem specifikus, vagy paradox hatá-

sokat észleltek /Bouckaert-Urban és Vendrig, 1981; Hrouda et al., 1983/, feltehetően azért, mert komplex volt a vizsgálati objektum /pl. izolált növényi szervek, vagy teljes növény/.

Az auxinoknak szerepe van a baktériumok virulenciájában is /Chernin et al., 1984/, és indol-3-ecetsav növényi hormon szintéziséért felelős géneket azonosítottak egyes agrobaktérium törzsek Ti-plazmidjának virulencia régiójában /Liu et al., 1982/. Más virulencia gének pedig auxin hatására aktiválódnak /C.I. Kado, Univ. of California; személyes közlése/.

A körülmények kontrollálhatóságán kívül az egysejtés transzformációs rendszer jellemzője, hogy minden egyes transzformált klón egyetlen sejtből ered, tehát tanulmányozhatók az egyedi transzformációs események. Nicotiana tabacum fajban a transzformánsokban a TL-DNS markereket - a hormonautotrófiát és az oktopin szintázt - vizsgálták és megállapították, hogy az oktopin szintáz gén és a hajtásregeneráció gátlása, sőt a hormonautotrófia is, egymástól függetlenül, nem minden sejtvonalonban fejeződik ki /Márton et al., 1979/. A TR-DNS-t mindeddig csak kevés klónozott tumorvonalon találták meg /Thomashow et al., 1980; Nester et al., 1984/, ezért nem volt lehetőség a viselkedését tanulmányozni. Az általunk vizsgált transzformált sejtvonalak között olyanok is voltak, amelyek a TL-DNS markereken kívül TR-DNS markereket is hordoztak. Sőt egy olyan sejtvonalat is találtunk,

amely csak TR-DNS markereket hordozott. A TL-DNS markerektől függetlenül nem mindig fejeződött ki mindkét TR-DNS marker. Az agropin egyes sejtvonalakból hiányzott, amikor a mannopin jelen volt a transzformált szövetben. Ez nincs ellentmondásban azzal, hogy az agropin valószínűleg mannopinból szintetizálódik /Ellis et al., 1984/. Az egyetlen ismert ilyen sejtvonalat egy olyan mutáns Ti-plazmiddal kapták, amelynek a teljes TL-régiója hiányzott /Leemans et al., 1983/.

N. tabacumban az egyes T-DNS markerek expressziójának hiánya egyes esetekben az adott T-DNS szakasz hiányának /Ooms et al., 1982/, más esetekben a jelenlevő gén metiláció révén bekövetkezett inaktivációjának /Van Slogteren et al., 1984/ volt a következménye. Agropint nem, csak mannopint tartalmazó tumorvonalakat sikerült növényen kiváltott tumorokból is előállítani. Ez azt mutatja, hogy az agropin hiányos sejtvonalak megjelenése nem kizárólag az egysejtes transzformációs rendszer jellegzetessége. A növényen kiváltott tumorok adott esetben nem tumoros, sőt nem transzformált sejteket is tartalmazhatnak, de mindig több transzformált sejt burjánzásából jönnek létre /Ooms et al., 1982/; ezért kezdetben minden tumormarker kifejeződik bennük. Az egysejtes transzformációs rendszerekben az egyes transzformációs események különbözősége nem mosódik össze.

Lényegében ugyanezeket a következtetéseket vonhattuk le a leucinopin-típusú baktériumokkal transzformált sejtvonalak esetében is, ahol a tumormarkerek közül csak a hormonautotrófiát, az agropint és a mannopint vizsgáltuk. Ebből

az is következik, hogy az agropin bioszintézise a leucino-
pin-típusu és az oktopin-típusu transzformánsokban azonos
vagy nagyon hasonló módon történik.

A Nicotiana plumbaginifolia sejtek és szövetek jellem-
ző viselkedése hormonmentes körülmények között az embrió-
képzés és a hajtásregeneráció volt. Habitualt sejtvonalt,
vagyis hormonautotróf kallusz csak igen kis gyakorisággal
jelent meg. A hajtásregeneráló készség olyan erős volt, hogy
a nem transzformált sejt kolóniák egy része túlélte a szelekció
során. Így lehetséges, hogy sikerült szelekciós rendszerünk-
ben, amely a transzformált sejtek hormonautotrófiáján alapul,
egy nem hormonautotróf transzformált sejt vonalat találni.
Ez az agropint és mannopint tartalmazó /TR-DNS markerek/
sejt vonalt gyökeres és virágzó növényeket regenerált, ame-
lyek fogékonyak voltak agrobaktérium fertőzésre. A gyökér-
fejlődést gátló, a TL-DNS-en lévő 4-es gént teszik felelőssé
a felülfertőzhetőség gátlásáért /Wullems et al., 1981b/.
A regenerált növények normális megjelenése és fogékonyága
arra utalt, hogy nincs bennük TL-DNS. DNS-DNS molekuláris
hibridizációjával sikerült bebizonyítani, hogy a TL-DNS való-
ban nincs jelen. A transzformált sejtekben csak TR-DNS szek-
venciákat találtunk. A hibridizációs kép egyszerűsége arra
utalt, hogy a TR-DNS csak egyetlen kópiában van jelen. Már
korábban is föltételezték, hogy a TR-DNS a TL-DNS-től füg-
getlenül képes integrálódni a növényi DNS-be. Ezt azzal a
Ti-plazmiddal támasztották alá, amely nem volt képes tumort
indukálni, mivel a teljes TL-régiója hiányzott, de az általa

fertőzött szövetekben agropint és mannopint találtak /Leemans et al., 1982/. Kísérleti bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a pTiAch5 oktopin-típusú Ti-plazmid TR-régiója akkor is képes volt függetlenül integrálódni a növényi DNS-be, ha a TL-régió is jelen volt és ép volt. A transzformáció gyakorisága tehát nagyobb, mint a hormonautotróf sejtvonalak gyakorisága.

Az agropin és a mannopin szintetizáló képesség a többi, eddig vizsgált T-DNS markerekhez hasonlóan öröklődött /Otten et al., 1981; Wullems et al., 1981b; Wöstemeyer et al., 1984/. Tetraploid növényeinkben a 3:1 hasadás az önbeporzás után és az 1:1 hasadás a vad-típusú növényvel való keresztezésben azt mutatta, hogy a TR-DNS csak egyetlen kromoszómán van jelen.

7 ÖSSZEFOGLALÁS

Létrehoztunk egy Nicotiana plumbaginifolia - Agrobacterium tumefaciens egysejtes transzformációs rendszert, amelyben a szelekció alapja a transzformált sejtek hormonautotrófiája volt. A transzformáció gyakoriságát a hormonautotróf kolóniák számával becsültük. Növekvő auxin/citokinin arány a tápoldatban növekvő transzformációs gyakorisághoz vezetett. Frissen izolált haploid és diploid protoplastokat egyaránt lehetett transzformálni. A virulens oktopin- és leucinopin-típusu tumorindukció-plazmidot hordozó baktériumokkal történő kezelés után a N. plumbaginifolia protoplastok citokininmentes, csak auxint tartalmazó tápoldatban is osztódtak. Nem minden transzformált sejtvonal mutatta az összes tumormarkert; nem minden transzformációs esemény vezetett hormonautotrófiához. Bebizonyítottuk, hogy az oktopin-típusu Ti-plazmidok T-régiójának jobboldali szegmentje, a TR-régió a baloldaltól függetlenül is képes volt integrálódni a növényi genomba és Mendeli módon öröklődött. Az agropin bioszintézise az oktopin-típusu /TR-DNS gének irányítása alatt/ és a leucinopin-típusu baktériumokban azonos, vagy nagyon hasonló uton szintetizálódik, mivel mindkét típusu transzformánsok között előfordult, hogy a mannopin mellől hiányzott az agropin. Ezek az eredmények alátámasztják a pTiAch5 Ti-plazmid TR-régiójának alkalmasságát egy újabb növényi génbeviteli vektor kifejlesztésére, mert várható, hogy a megfelelően módosított TR-DNS-be beépi-

tett gének stabilan integrálódnak a növényi DNS-be anélkül,
hogy a növényregenerációt zavarnák.

8 FÜGGELEK

RM táptalaj dohány tenyésztéshez /Murashige és
Skoog, 1962/

Törzsoldatok:

Bemérés 1 dm³-re

RM-I

| | |
|--------------------------------------|--------|
| NH ₄ NO ₃ | 6,60 g |
| KNO ₃ | 7,60 g |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 1,76 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1,48 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,68 g |

RM-II

| | |
|--|--------|
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 5,57 g |
| Na ₂ EDTA·2H ₂ O | 7,45 g |

RM-III

| | |
|---|--------|
| H ₃ BO ₃ | 0,62 g |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 2,23 g |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,86 g |
| KJ | 83 mg |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 25 mg |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 2,5 mg |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 2,5 mg |

A táptalaj összeállítása: 1 dm³-hez kell 250 cm³ RM-I, 5 cm³ RM-II, 10 cm³ RM-III, 30 g szaharóz és 7 g Bacto Agar /Difco Lab/. A pH-t 5,8-ra állítjuk, majd kuktában 20 percig sterilizáljuk.

K₃ táptalaj protoplaszttenyésztéshez /Maliga, 1983/

| Komponens | Bemérés 5 dm ³ | 2-szeres koncentrációju oldathoz |
|---|---------------------------|----------------------------------|
| KNO ₃ | 24,0 | g |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 8,8 | g |
| NH ₄ NO ₃ | 2,5 | g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 2,5 | g |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 1,5 | g |
| /NH ₄ / ₂ SO ₄ | 1,3 | g |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 100,0 | mg |
| H ₃ BO ₃ | 30,0 | mg |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 23,0 | mg |
| Nikotinsav | 10,0 | mg |
| Piridoxin·HCl | 10,0 | mg |
| Tiamin·HCl | 100,0 | mg |
| m-Inozit | 1,0 | g |
| D-Xylóz | 2,5 | g |
| RM-II oldat | 50,0 | cm ³ |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 2,40 | mg |
| KJ | 7,50 | mg |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0,25 | mg |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,25 | mg |

A táptalaj összeállítása: a kétszeres töménységű törzsoldathoz 0,4 M végkoncentrációnak megfelelő mennyiségű szaharózt adunk, a hormonokat vizes törzsoldatból adagoljuk, majd desztillált vízzel feltöltjük a végtérfogatra. A pH-t 5,8-ra állítjuk, majd 50-200 cm³-es részletekben kuktában 20 percig sterilizáljuk.

9 FELHASZNÁLT IRODALOM

- Akiyoshi, D.E., Klee, H., Amasino, R.M., Nester, E.W., Gordon, M.P. /1984/ T-DNA of Agrobacterium tumefaciens encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5994-5998.
- Barker, R.F., Idler, K.B., Thompson, D.V., Kemp, J.D. /1983/ Nucleotide sequence of the T-DNA region from the Agrobacterium tumefaciens octopine Ti plasmid pTil5955. Plant Mol. Biol. 2, 335-350.
- Bouckaert-Urban, A.-M., Vendrig, J.C. /1981/ The influence of growth regulators on crown-gall initiation on cotyledonary leaves of Helianthus giganteus L. Z. Pflanzenphysiol. 103, 75-81.
- Braun, A.C., /1962/ Tumor inception and development in the crown gall disease. Ann. Rev. Plant Physiol. 13, 533-558.
- Braun, A.C., White, P.R. /1943/ Bacteriological sterility of tissues derived from secondary crown gall tumors. Phytopathol. 33, 85-100.
- Cherayil, J.D., Lipsett, M.N. /1977/ Zeatin Ribonucleosides in the Transfer Ribonucleic Acid of Rhizobium leguminosarum, Agrobacterium tumefaciens, Corynebacterium fascians, and Erwinia amylovora. J. Bact. 131, 741-744.
- Chermin, L.S., Lobanok, E.V., Fomicheva, V.V., Kartel, N.A. /1984/ Crown gall-suppressive IncW R plasmids cause a decrease in auxin production in Agrobacterium tumefaciens. Mol. Gen. Genet. 195, 195-199.
- Chilton, M.-D., Drummond, M.H., Merlo, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P., Nester, E.W. /1977/ Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell 11, 263-271.
- Chilton, M.-D., Saiki, R.K., Yadav, N., Gordon, M.P., Quetier, F. /1980/ T-DNA from Agrobacterium Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4060-4064.

- Dahl, G.A., Tempé, J. /1983/ Studies on the use of toxic precursor analogs of opiines to select transformed plant cells. *Theor. Appl. Genet.* 66, 237-239.
- De Cleene, M., De Ley, F. /1976/ The host range of crown-gall. *Bot. Rev.* 42, 389-466.
- Denhardt, D.T. /1966/ A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 23, 641-646.
- De Vos, G., De Beuckeleer, M., Van Montagu, M., Schell, J. /1981/ Restriction Endonuclease Mapping of the Octopine Tumor-Inducing Plasmid pTiAch5 of Agrobacterium tumefaciens. *Plasmid* 6, 249-253.
- Ellis, J.G., Ryder, M.H., Tate, M.E. /1984/ Agrobacterium tumefaciens TR-DNA encodes a pathway for agropine, *Mol. Gen. Genet.* 195, 466-473.
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B. /1983/ A technique for radio-labeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- Firmin, J.L., Fenwick, G.R. /1978/ Agropine: A major new plasmid determined metabolite in crown gall tumours. *Nature* 276, 842-844.
- Firoozabady, E., Galbraith, D.W. /1984/ Presence of a cell wall is not required for transformation of Nicotiana by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 3, 175-188.
- Gielen, J., De Beuckeleer, M., Seurinck, J., Deboeck, F., De Greve, H., Lemmers, M., Van Montagu, M., Schell, J. /1984/ The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5. *EMBO J.* 3, 835-846.
- Guyon, P., Chilton, M.-D., Petit, A., Tempé, J. /1980/ Agropine in "null type" tumours: evidence for generality of the opine concept. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2693-
- Hanold, D. /1983/ In vitro transformation of protoplast-derived Hyoscyamus muticus cells by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Sci. Lett.* 30, 177-183.
- Holsters, M., Hernalsteens, J.P., Van Montagu, M., Schell, J. /1982/ Ti Plasmids of Agrobacterium tumefaciens: The Nature of the TIP. In *Molecular Biology of Plant Tumors* /G. Kahl and J. Schell, eds./ Academic Press, New York, pp. 269-298.



- Hrouda, M., Ondrej, M. /1983/ The effects of growth regulators on formation of crown gall tumours on potato tuber discs. *Biologia Plantarum /Praha/* 25, 28-32.
- Jacobsen, H., Klenow, H., Overgaard-Hansen, K. /1974/ The N-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from Escherichia coli and of the large and the small fragments obtained by limited proteolysis. *Eur. J. Biochem.* 45, 623-627.
- Jia, J., Shillito, R.D., Potrykus, I. /1983/ Crown gall transformation of regenerating protoplasts of haploid and diploid Petunia hybrida var. Mitchell by Agrobacterium tumefaciens. *Z. Pflanzenphysiol.* 112, 1-6.
- Jouanneau, J.P., de Marsac, T. /1973/ Stepwise effects of cytokinin activity and DNA synthesis upon mitotic cycle events in partially synchronized tobacco cells. *Exp. Cell. Res.* 77, 167-174.
- Kahl, G. /1982/ Molecular biology of wound Healing: The conditioning phenomenon. In *Molecular Biology of Plant Tumours* /G. Kahl and J. Schell, eds./ Academic Press, London, pp. 211-267.
- Kahl, G., Schell, J.: *Molecular Biology of Plant Tumours*, Academic Press, London, 1982.
- Klapwijk, P.M., Van Breukelen, J., Korevaar, K., Ooms, G., Schilperoort, R.A. /1980/ Transposition of Tn904 encoding streptomycin resistance into the octopine Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens. *J. Bact.* 141, 129-136.
- Krens, F.A., Molendijk, L., Wullems, G.J., Schilperoort, R.A. /1983/ The role of bacterial attachment in the transformation of cell wall regenerating tobacco protoplasts by Agrobacterium tumefaciens. *J. Bacteriol. Thesis 1983* pp. 41-58.
- Leemans, J., Deblaere, R., De Greve, H., Hernalsteens, J.P., Van Montagu, M., Schell, J. /1982/ Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls. *EMBO J.* 1, 147-152.
- Leemans, J., Hernalsteens, J.P., Deblaere, R., De Greve, H., Thia-Toong, L., Van Montagu, M., Schell, J. /1983/ Genetic analysis of T-DNA and regeneration of transformed plants. Pühler, A. /ed/ *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 322-330.

- Leemans, J., Shaw, C., De Blaere, R., De Greve, H., Hernalsteens, J.P., Maes, M., Van Montagu, M., Schell, J. /1981/ Site-Specific Mutagenesis of Agrobacterium Ti Plasmids and Transfer of Genes to Plant Cells. J. Mol. Appl. Genet. 1, 149-164.
- Lemmers, M., De Beuckeleer, M., Holsters, M., Zambryski, P., Depicker, A., Hernalsteens, J.P., Van Montagu, M., Schell, J. /1980/ Internal organization, boundaries and integration of Ti-plasmid DNA in nopaline crown gall tumours. J. Mol. Biol. 144, 353-376.
- Liu, S.-T., Perry, K.L., Schardl, C.L., Kado, C.I. /1982/ Agrobacterium Ti plasmid indoleacetic gene is required for crown gall oncogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2812-2816.
- Magnien, E., Devreux, M. Plant Cell Cultures: Results and Perspectives /Sala, F., Parisi, B., Cella, R., Cifferi, O., Eds./Elsevier /Horth Holland, Amsterdam, 1980. p. 121.
- Maliga, P. /1983/ Cell culture procedures for Nicotiana plumbaginifolia: A correction. Plant Mol. Biol. Reporter 1, 137.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, pp. 224-228.
- Márton, L.: Transformation of tobacco cells by coculture with Agrobacterium tumefaciens. In: Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 1 /I. Vasil, ed./ Academic Press, New York, 1984, pp. 514-521.
- Márton, L., Wullems, G.J., Molendijk, L., Schilperoort, R.A. /1979/ In vitro transformation of cultured cells of Nicotiana tabacum by Agrobacterium tumefaciens. Nature 277, 129-133.
- Matthysse, A.G. /1983/ Role of Bacterial Cellulose Fibrils in Agrobacterium tumefaciens Infection. J. Bact. 154, 906-915.
- Menczel, L., Nagy, F., Kiss, Zs.R., Maliga, P. /1981/ Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of Nicotiana tabacum + Nicotiana glauca + Correlation of resistance to N. Tabacum plastids. Theor. Appl. Genet. 59, 191-195.

- Meyer, Y., Cooke, R. /1979/ Time course of hormonal control of the first mitosis in tobacco mesophyll protoplasts cultivated in vitro. *Planta* 147, 181-185.
- Miller, J.H. /1972/ Experiments in Molecular Genetics /Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY/ p. 21.
- Murashige, T., Skoog, F. /1962/ A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 472-497.
- Müller, J.F., Missionier, C., Caboche, M. /1983/ Low density growth of cells derived from Nicotiana and Petunia protoplasts: Influence of the source of protoplasts and comparison of the growth-promoting activity of various auxins. *Physiol. Plant.* 57, 35-41.
- Nagy, J.I., Maliga, P. /1976/ Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of Nicotiana sylvestris. *Z. Pflanzenphysiol.* 78, 453-455.
- Naylor, J., Sander, G., Skoog, F. /1954/ Mitosis and cell enlargement with cell division in excised tobacco pith tissue. *Physiol. Plant.* 7, 25-29.
- Nester, E.W., Gordon, M.P., Amasino, R.M., Yanofsky, M.F. /1984/ Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35, 387-413.
- Ooms, G., Bakker, A., Molendijk, L., Wullems, G.J., Gordon, M.P., Nester, E.W., Schilperoort, R.A. /1982/ T-DNA organization in homogeneous and heterogeneous octopine-type crown gall tissues of Nicotiana tabacum. *Cell* 30, 589-597.
- Ooms, G., Hooykaas, P.J.J., Molenaar, G., Schilperoort, R.A. /1981/ Crown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by Agrobacterium tumefaciens carrying mutated octopine Ti-plasmids; Analysis of T-DNA functions *Gene* 14, 33-50.
- Otten, L.B.B.M., Schilperoort, R.A. /1978/ A rapid microscale method for the detection of lysopine and nopaline dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 527, 497-500.
- Otten, L., De Greve, H., Hornalsteens, J.P., Van Montagu, M., Schieder, O., Straub, J., Schell, J. /1981/ Mendelian Transmission of Genes Introduced into Plants by the Ti Plasmids of Agrobacterium tumefaciens *Mol. Gen. Genet.* 183, 209-213.

- Palni, L.M.S., Horgan, R. /1983/ Cytokinins in transfer RNA of normal and crown-gall tissue of Vinca rosea. *Planta* 159, 178-181.
- Radloff, R., Bauer, W., Vinograd, J. /1967/ A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: The closed circular DNA in Hela cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 1514-1521.
- Schell, J., Van Montagu, M., De Beuckeleer, M., De Block, M., Depicker, A., De Wilde, M., Engler, G., Genetello, C., Hernalsteens, J.-P., Holsters, M., Seurinck, J., Silva, B., Van Vliet, F., Villaroel, R. /1979/ Interactions and DNA transfer between Agrobacterium tumefaciens, the Ti-plasmid and the plant host. *Proc. R. Soc. Lond. B* 204, 251-266.
- Schröder, J., Schröder, G., Huisman, H., Schilperoort, R.A., Schell, J. /1981/ The mRNA for lysopine dehydrogenase in plant tumor cells is complementary to a Ti plasmid fragment. *FEBS Lett.* 129, 166-168.
- Schröder, G., Waffenschmidt, S., Weiler, E.W., Schröder, J. /1984/ The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.* 138, 387-391.
- Sidorov, V.A., Maliga, P. /1982/ Fusion-Complementation Analysis of Auxotrophic and Chlorophyll-Deficient Lines Isolated in Haploid Nicotiana plumbaginifolia Protoplast Cultures. *Mol. Gen. Genet.* 186, 328-332.
- Skoog, F., Miller, C.O. /1957/ *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118-131.
- Smith, E.F., Townsend, C.O. /1907/ A plant tumor of bacterial origin. *Science*, 25, 671-673.
- Southern, E.M. /1975/ Detection of specific sequences among DNA separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Summerton, J., Atkins, T., Bestwick, R. /1983/ A rapid method for preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 133, 79-84.
- Taylor, B., Powell, A. /1983/ Isolation of plant DNA and RNA. *Focus* 4, 3-4.
- Tempé, J., Petit, A. /1983/ *La Piste des Opines*. Pühler, A. /ed./ *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 13-32.

- Thomashow, M.F., Nutter, R., Montoya, A.L., Gordon, M.P., Nester, E.W. /1980/ Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell* 19, 729-739.
- Trevelyan, W.E., Procter, D.P., Harrison, J.S. /1950/ Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature /London/* 166, 444-446.
- Van Larebeke, N., Genetello, C., Schell, J., Schilperoort, R.A., Hermans, A.K., Hernalsteens, J.P., Van Montagu, M. /1975/ Acquisition of tumour-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. *Nature* 255, 742-743.
- Van Slogteren, G.M.S., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A. /1984/ Silent T-DNA genes in plant lines transformed by Agrobacterium tumefaciens are activated by grafting and by 5-azacytidine treatment. *Plant Mol. Biol.* 3, 333-336.
- Wahl, G.M., Stern, M., Stark, G.R. /1979/ Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3683-3687.
- Weiler, E.W., Spanier, K. /1981/ Phytohormones in the formation of crown gall tumours. *Planta*, 153, 326-337.
- Wüstemeyer, A., Otten, L.A.B.M., Schell, J.S. /1984/ Sexual transmission of T-DNA in abnormal tobacco regenerants transformed by octopine and nopaline strains of Agrobacterium tumefaciens. *Mol. Gen. Genet.* 194, 500-507.
- Wullems, G.J., Molendijk, L., Ooms, G., Schilperoort, R.A. /1981a/ Differential expression of crown gall tumor markers in transformants obtained after in vitro Agrobacterium tumefaciens-induced transformation of cell wall regenerating protoplasts derived from Nicotiana tabacum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4344-4348.
- Wullems, G.J., Molendijk, L., Ooms, G., Schilperoort, R.A. /1981b/ Retention of tumor markers in F₁ progeny plants from in vitro induced octopine and nopaline tumor tissues. *Cell* 24, 719-727.
- Zambryski, P. /1982/ Verification of structure of mutant Ti plasmids. In The use of Ti plasmid as a cloning vector for genetic engineering in plants. EMBO Course on Ti plasmids, Rijksuniversiteit Gent, Belgium 4-23 August 1982, pp. 24-32.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton mondok köszönetet témavezetőmnek,
Dr. Márton Lászlónak, értékes tanácsaiért és segítségéért.
Továbbá Dr. Zoja Katarová-nak /SZBK Biokémiai Intézet/,
akitől a DNS polimeráz enzimet kaptuk.